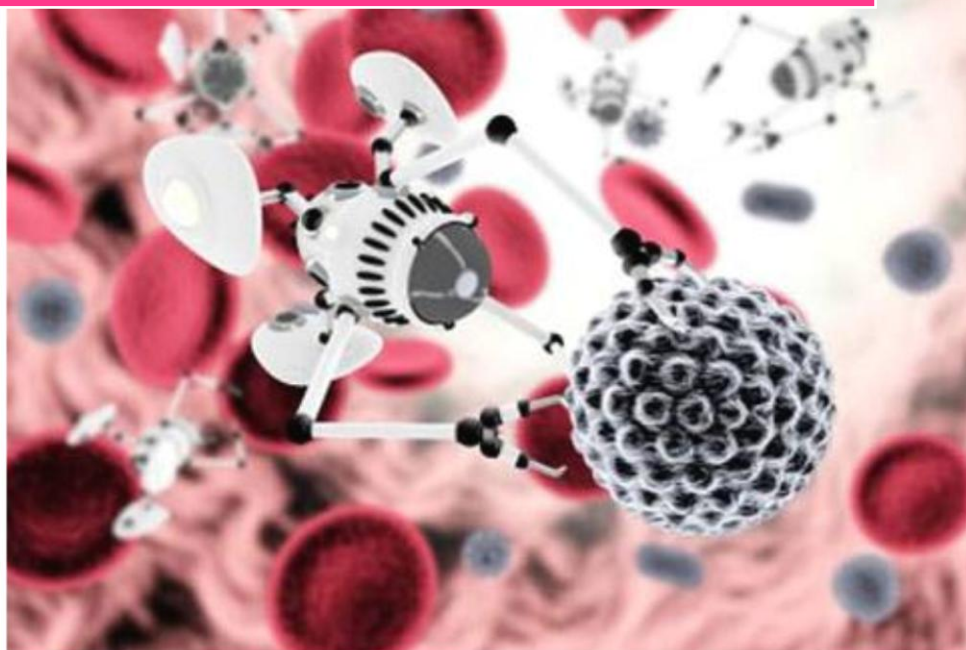


Memoria que presenta
Gladys Amalia Ruiz Estrada
para optar al Grado de Doctor

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS BASADO EN NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON POLIETILÉNGLICOL
PARA EL TRATAMIENTO DE DIFERENTES
ENFERMEDADES**



Universidad Autónoma de Madrid,
Departamento de Física Aplicada
Instituto de Ciencia de Materiales
de Madrid, Departamento de
Biomateriales y Materiales
Bioinspirados
Madrid, 2014

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS
BASADO EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS
CON POLIETILÉNGLICOL PARA EL TRATAMIENTO DE
DIFERENTES ENFERMEDADES

Gladys Amalia Ruiz Estrada

Director de tesis

María del Puerto Morales Herrero

Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, CSIC

Departamento de Biomateriales y Materiales
Bioinspirados

Tutor académico: Miguel Manso

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Física Aplicada

Madrid, 2014



Resumen

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (magnetita/maghemita) constituyen uno de los sistemas más prometedores dentro del campo de la biomedicina y biotecnología. En la presente tesis se ha estudiado la preparación de suspensiones coloidales de partículas de magnetita/maghemita para aplicaciones biotecnológicas o biomédicas, abarcando desde la síntesis de partículas por métodos convencionales como la coprecipitación, hasta métodos más novedosos como la descomposición en medio orgánico para la obtención de partículas uniformes. Se han seleccionado tres tipos de recubrimientos, un polímero natural como la agarosa, una molécula de bajo peso molecular como el DMSA, con propiedades apantalladoras limitadas pero muchos grupos activos para ser funcionalizados y un polímero como el PEG muy biocompatible.

Las nanopartículas obtenidas por coprecipitación fueron recubiertas con agarosa para ser empleadas como un soporte para la inmovilización de proteínas de fusión que contienen como etiqueta de afinidad un dominio tipo lectina. Este sistema permitió la detección y purificación de proteínas recombinantes fusionadas al módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus*. La interacción entre las nanopartículas y la proteína de fusión presentó un carácter bioespecífico, dirigido espacialmente, reversible y accesible al corte con proteasas. Además, al conjugar enzimas al módulo lectina de LSL fue posible mantener la actividad enzimática de las mismas sobre el soporte magnético y posteriormente recuperar la proteína manteniendo su actividad biológica.

Para la preparación de nanopartículas para ensayos in vivo (agentes de contraste en Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o transportadoras de fármacos) se ha elegido el método de la descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro en disolventes orgánicos y en presencia de surfactantes. Este método permite la obtención de nanopartículas magnéticas monodispersas y muy cristalinas cuyo tamaño medio se puede controlar mediante el ajuste de diferentes parámetros de la reacción: cantidad de reactivos, disolvente, surfactante, tiempo, etc. La transferencia a medio acuoso se llevó a cabo mediante una reacción de intercambio de ligandos del ácido oleico de la superficie de las nanopartículas por el ácido dimercaptosuccínico. Posteriormente las nanopartículas fueron conjugadas covalentemente a polietilenglicol (PEG) derivatizado con grupos amino en el terminal de la cadena, a través de una reacción mediada por carbodiimida, permitiendo obtener suspensiones de nanopartículas estables en agua con diámetros hidrodinámicos menores de 100 nm apropiados para la aplicación biomédica de estas nanopartículas.

Las nanopartículas obtenidas se evaluaron *in vitro* como agentes de contraste para imagen por Resonancia Magnética Nuclear midiendo las propiedades relaxométricas de las suspensiones coloidales, y como transportadores de fármacos, estudiando su posible funcionalización con dos péptidos: CIGB300 y CIGB500 con vistas al tratamiento de diferentes enfermedades. Los valores de relaxividad obtenidos son similares o mayores que los de los agentes de contraste comerciales.

La citotoxicidad de las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG se evaluó en diferentes líneas celulares, así como posibles afectaciones en los parámetros hematológicos o daños genotóxicos. Los resultados demuestran que las nanopartículas no tienen efectos tóxicos, ni genotóxicos asociados a su tratamiento a las dosis estudiadas (0.3 mg/ml *in vitro* y 2,5 mg/kg *in vivo*).

También se siguió la farmacocinética y biodistribución de las nanopartículas en un modelo animal de ratas Wistar. Mediante la combinación de métodos magnéticos y no magnéticos se pudo evaluar la acumulación de las nanopartículas en hígado, bazo, pulmones y riñones y seguir su proceso de degradación a lo largo del tiempo y su influencia en determinados puntos de la ruta metabólica del hierro. Los resultados obtenidos permiten describir de forma general el proceso de biodistribución de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG en un modelo animal de ratas Wistar. Las nanopartículas administradas de forma intravenosa, a través de la vena de la cola, se mantienen en el torrente sanguíneo aproximadamente 10 minutos para las NP-DMSA y ~ 1 h para NP-PEG-(NH₂)₂. Estas se acumulan en órganos bien irrigados y ricos en macrófagos como el hígado, los pulmones y el bazo. El proceso de opsonización de las nanopartículas, así como su reconocimiento por las células del sistema retículo endotelial ocurre rápidamente. Las nanopartículas son incorporadas a la célula vía endocitosis y se ubican en compartimentos acídicos donde comienza su proceso de degradación, así como la activación de la ruta metabólica del hierro. Las proteínas DMT-1 y ferriredutasa median en el proceso de liberación del hierro al citosol, el cual puede seguir diferentes vías: incorporación a proteínas mitocondriales con grupos hierro-azufre, síntesis del hemo, almacenamiento en complejo con ferritina o ser exportado al exterior celular. Al ser exportado a la matriz extracelular en su forma ferrosa, el hierro es rápidamente reconocido por dos proteínas (Ceruloplasmina y Hefestina) que lo oxidan para evitar la generación de radicales libres, y daños en membranas celulares y proteínas. Este Fe³⁺ es reconocido por la apo-transferrina, que se activa a transferrina y es la proteína encargada de su transporte hasta la médula ósea (función hematopoyética) o para su almacenamiento en el hígado.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción2

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1.1. NANOMEDICINA..... | 2 |
| 1.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS..... | 5 |
| 1.3. APLICACIONES BIOMÉDICAS | 6 |
| 1.4. TOXICIDAD | 9 |
| 1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO | 10 |

Capítulo 2. Materiales y Métodos..... 14

| | |
|--|----|
| 2.1. ÓXIDOS DE HIERRO | 14 |
| 2.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE PARTÍCULAS UNIFORMES..... | 15 |
| 2.2.1. Coprecipitación | 17 |
| 2.2.2. Descomposición en medio orgánico..... | 17 |
| 2.2.3. Sección Experimental | 18 |
| 2.2.3.1. Síntesis de nanopartículas por coprecipitación..... | 18 |
| 2.2.3.2. Síntesis de nanopartículas por descomposición en medio orgánico..... | 19 |
| 2.3. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL..... | 21 |
| 2.3.1. Recubrimiento con Agarosa..... | 21 |
| 2.3.2. Intercambio de ligandos con DMSA | 22 |
| 2.3.3. Modificación con PEG | 23 |
| 2.3.4. Sección Experimental | 26 |
| 2.3.4.1. Recubrimiento con Agarosa | 26 |
| 2.3.4.2. Intercambio de ligandos con DMSA..... | 27 |
| 2.3.4.3. Reacción de conjugación a PEG..... | 27 |
| 2.4. FUNCIONALIZACIÓN CON DIFERENTES MOLÉCULAS BIOACTIVAS | 28 |
| 2.4.1. Proteína de fusión que contiene un dominio peptídico lectina β -trébol..... | 28 |
| 2.4.2. CIGB-300..... | 29 |
| 2.4.3. CIGB-500..... | 29 |
| 2.5. CARACTERIZACIÓN..... | 30 |
| 2.5.1. Materiales..... | 30 |
| 2.5.2. Técnicas..... | 30 |
| 2.5.2.1. Nanopartículas..... | 30 |
| 2.5.2.2. Ensayos celulares..... | 33 |
| 2.5.2.3. Estudios <i>in vivo</i> | 34 |

Capítulo 3. Inmovilización de enzimas sobre nanopartículas magnéticas 36

| | |
|---|----|
| 3.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS RECUBIERTAS DE AGAROSA..... | 37 |
| 3.2. ESTUDIO DE INMOVILIZACIÓN DE LECTINAS | 40 |
| 3.2.1. Interacción con NPM con diferentes recubrimientos..... | 40 |
| 3.2.2. Caracterización químico-física de los complejos LSL ₁₅₀ -NPM..... | 42 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. CARÁCTER BIOESPECÍFICO DEL SISTEMA LSL ₁₅₀ -NPM | 45 |
| Capítulo 4. Nanopartículas magnéticas para diagnóstico y tratamiento..... | 52 |
| 4.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS UNIFORMES PARA APLICACIONES <i>IN VIVO</i> | 53 |
| 4.1.1. <i>Descomposición térmica de Fe(acac)₃ en medio orgánico</i> | 53 |
| 4.1.2. <i>Conjugación a diferentes polímeros basados en polietilenglicol</i> | 56 |
| 4.1.3. <i>Caracterización químico-física de las nanopartículas conjugadas a PEG</i> | 58 |
| 4.2. UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON PEG | 65 |
| 4.3. EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES DE CONTRASTE PARA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR | 71 |
| 4.4. CONJUGACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS A DOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS | 74 |
| Capítulo 5. Toxicidad..... | 81 |
| 5.1. EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS NANOPARTÍCULAS RECUBIERTAS CON DMSA O MODIFICADAS CON PEG | 85 |
| 5.2. INTERACCIÓN CÉLULA-NANOPARTÍCULAS | 89 |
| 5.3. VIABILIDAD CELULAR | 93 |
| 5.4. HEMATOTOXICIDAD | 96 |
| 5.4.1. <i>Análisis in vitro</i> | 97 |
| 5.4.2. <i>Análisis in vivo</i> | 100 |
| 5.4.2.1. Estudio de genotoxicidad | 102 |
| Capítulo 6. Biodistribución y eliminación | 105 |
| 6.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN | 105 |
| 6.2. TIEMPO DE RESIDENCIA EN SANGRE | 108 |
| 6.3. BIODISTRIBUCIÓN | 110 |
| 6.3.1. <i>Análisis morfológico</i> | 111 |
| 6.3.2. <i>Análisis elemental</i> | 114 |
| 6.3.3. <i>Medidas magnéticas DC</i> | 115 |
| 6.3.4. <i>Susceptibilidad AC</i> | 119 |
| 6.3.5. <i>Análisis in vivo por Resonancia Magnética Nuclear</i> | 122 |
| 6.4. METABOLISMO DEL HIERRO | 128 |
| Capítulo 7. Conclusiones | 134 |
| Anexo I: Magnetismo | 138 |
| Anexo II: Técnicas experimentales | 141 |
| Referencias bibliográficas..... | 155 |
| Curriculum vitae | 175 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Lista de Publicaciones | 178 |
| Agradecimientos..... | 179 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tamaño relativo de los organismos y biomoléculas que pueden interactuar con las nanopartículas. | 3 |
| Figura 2. Esquema cualitativo del tiempo de permanencia en sangre de las nanopartículas en función del tamaño (Adaptado de (Arruebo et al., 2007)). | 8 |
| Figura 3. Objetivos del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral. | 12 |
| Figura 4. Polimorfismo del hierro y versatilidad del material en diferentes aplicaciones (Adaptado de (Tartaj et al., 2011)) | 14 |
| Figura 5. Montaje experimental del proceso de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por descomposición en medio orgánico. | 20 |
| Figura 6. Representación esquemática de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico (izquierda) y modificadas con DMSA después de la reacción de intercambio de ligandos (derecha)..... | 23 |
| Figura 7. Representación esquemática de los procedimientos empleados para la obtención de nanopartículas recubiertas de agarosa..... | 38 |
| Figura 8. Imágenes de TEM de nanopartículas obtenidas por coprecipitación: A) 8 nm. B) 12 nm. Propiedades coloidales de las nanopartículas obtenidas en los diferentes procedimientos. (C) Radios hidrodinámicos. (D) Potencial Z en función del pH..... | 39 |
| Figura 9. (A) Representación esquemática de las NPM con diferentes recubrimientos empleadas en el ensayo de unión a LSL ₁₅₀ y LBL ₁₅₂ . (B-C) Análisis por SDS-PAGE (gel: 15%) del sobrenadante colectado después de 2 horas de incubación de las nanopartículas en presencia de las proteínas a LSL ₁₅₀ y LBL ₁₅₂ . Los geles fueron teñidos con Comassie blue (CBB). (D) Análisis densitométrico con el software Image J v1.32 para la cuantificación de proteína libre después del ensayo de unión a las NPM (■LSL ₁₅₀ y ■LBL ₁₅₂). | 41 |
| Figura 10. Propiedades coloidales de los complejos NPM-LSL ₁₅₀ . (A) Radio hidrodinámicos de las NPM recubiertas de agarosa (M8-Agr) libre y en complejo con la proteína. (B) Radio hidrodinámicos de las NPM de maghemita (M8) libre y en complejo con la proteína. (C) Variación de la carga superficial a pH 7 después de la unión de la proteína. (D) Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) de las NPM recubiertas de agarosa libres y en complejo con LSL ₁₅₀ . (E-H) Análisis termogravimétrico de las NPM antes y después de la unión de la proteína. | 44 |
| Figura 11. Carácter bioespecífico y reversible en la unión de LSL ₁₅₀ y LBL ₁₅₂ a las distintas NPM. (A) Ensayo A en medio acuoso. (B) Ensayo B en presencia de lactosa. (C) Ensayo C en medio acuoso y posterior adición de lactosa al medio. Análisis densitométrico | |

con el software Image J v1.32 para la cuantificación de proteína libre después del ensayo de unión a las NPM (■LSL₁₅₀ y ■LBL₁₅₂).....46

Figura 12. Interacción de LSL₁₅₀-EGFP con las NPM recubiertas de agarosa (■LBL₁₅₀-EGFP, ■LSL₁₅₀, ■EGFP). 1: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa. 2: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 3: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 4: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 5: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 6: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8 en ausencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 7: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 8: Patrón de peso molecular.....48

Figura 13. Interacción de LSL-BTL2 con las NPM recubiertas de agarosa (M8-Agr) y sin recubrimiento (M8). 1. Control LSL-BTL2. 2. LSL₁₅₀-BTL2 incubadas con M8-Agr y analizado el sobrenadante. 3. M8-Agr-LSL-BTL2 incubadas en presencia de lactosa 0,2M. 4. LSL₁₅₀-BTL2 incubadas con M8 y analizado el sobrenadante. 5. M8-LSL-BTL2 incubadas en presencia de lactosa 0,2M. 6. Patrón de peso molecular.....48

Figura 14. Ensayo de actividad enzimática de la proteína de fusión LSLt-BTL2 inmovilizada sobre las nanopartículas recubiertas con agarosa M8-Agr (arriba) y sobre los núcleos de maghemita sin recubrimiento M8 (abajo). La proteína se incubó con las NPM durante 2 h a temperatura ambiente. La fracción inmovilizada se separó de la fracción soluble, donde permanece la proteína que no se ha unido. Posteriormente, la fracción inmovilizada se trató con 0,2 M lactosa para disociar el complejo lectina:NPM y obtener la fracción eluida. En cada una de las fracciones se midió la actividad hidrolítica de la enzima BTL2.49

Figura 15. Esquema del avance de la reacción descomposición térmica del Fe(acac)₃ en medio orgánico y en presencia de surfactantes.....55

Figura 16. Imágenes de TEM de partículas de magnetita de diferentes tamaños obtenidas al variar el tiempo de reacción. A: 90 minutos y C: 30 minutos. B y D: Histograma de tamaños correspondiente. E) Curvas de magnetización a 250K (línea roja: D7nm, línea negra: D12nm).56

Figura 17. Esquema de la reacción de conjugación de las NP-DMSA a los diferentes polímeros basados en PEG: A) O-(2-aminoetil) polietilenglicol, (750 y 5000 Da) (PEG-NH₂), B) O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, (2000, 6000 ó 20000 Da) (PEG-(NH₂)₂), y C) poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol)-poli (propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), 1900 Da (PEG-Prop-(NH₂)₂).57

Figura 18. Imágenes de TEM de las nanopartículas: A) D12 B) NP-PEG-NH₂ 750 Da, C) NP-PEG-(NH₂)₂ 2000 Da, y D) NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ 1900 Da.....58

Figura 19. Propiedades coloidales de las NP-DMSA de 7 y 12 nm conjugadas a distintas cadenas de PEG. A) Valores de radio hidrodinámico para las NP-DMSA de 7 nm (línea de puntos) y 12 nm (línea continua). B) Evolución del potencial Z en función del pH para las nanopartículas de 12 nm después de conjugar a las distintas cadenas de PEG. C) Análisis termogravimétrico de las muestras de 12 nm. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [Δ] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).....59

Figura 20. Izquierda, espectro infrarrojo de (a) NP-DMSA, (b) NP-DMSA-PEG-NH₂, (c) NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂, (d) NP-DMSA-PEG-Prop-(NH₂)₂, (e) DMSA, (f) PEG-NH₂, (g) PEG-(NH₂)₂, (h) PEG-Prop-(NH₂)₂. Derecha, espectro infrarrojo de los productos de reacción de las NP con los diferentes polímeros en ausencia (-) o presencia de EDC (+): (i) NP-DMSA-PEG-NH₂, (j) NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂, (k) NP-DMSA-PEG-Prop-(NH₂)₂.....62

Figura 21. A) Variación de la carga superficial de suspensiones acuosas de nanopartículas de 12 nm modificadas con diferentes derivados de PEG en función del tiempo de reacción. B) Curvas termogravimétricas (TGA) para NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂ a 8 y 30 horas de tiempo de reacción. C) Variación de la carga superficial de suspensiones acuosas de nanopartículas de 12 nm modificadas con diferentes derivados de PEG en función de la cantidad de reactivo añadido. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [Δ] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).....63

Figura 22. Radio hidrodinámico de las suspensiones de nanopartículas después de una hora a diferentes concentraciones de PBS y SDS. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [Δ] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).....65

Figura 23. A) Representación esquemática del ensayo tipo ELISA desarrollado para la caracterización de nanopartículas conjugadas a PEG. B) Detección de NP conjugadas a PEG de cadena corta mediante ELISA. C) Espectro infrarrojo de NP conjugadas a PEG-(NH₂)₂ 2000 Da empleando cantidades crecientes del polímero en la reacción. Detección por ELISA de NP conjugadas a PEG-(NH₂)₂ 2000 Da empleando cantidades crecientes del polímero en la reacción.....67

Figura 24. Caracterización físico-química de las NP-DMSA conjugadas a diferentes cadenas de PEG. A) Análisis termogravimétrico de los conjugados. B) Espectro infrarrojo de las diferentes muestras. C) Evolución del potencial Z en función del pH. [I] NP-DMSA, [II] NP-PEG-NH₂ (750 Da), [III] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ (1900 Da), [IV] NP-PEG-(NH₂)₂ (2000 Da), [V] NP-PEG-(NH₂)₂ (6000 Da), [VI] NP-PEG-(NH₂)₂ (20000 Da).....69

Figura 25. A) Detección de NP conjugadas a PEG de cadena larga mediante ELISA. B) Espectro infrarrojo de NP conjugadas a PEG de cadena larga.69

| | |
|---|----|
| Figura 26. A) Efecto del plasma en la detección de NP conjugadas a PEG de cadena larga..... | 70 |
| Figura 27. Propiedades relaxométricas de las nanopartículas recubiertas con PEG. ([○] NP-PEG-NH ₂ , [■] NP-PEG-(NH ₂) ₂ , y [Δ] NP-PEG-Prop-(NH ₂) ₂)..... | 72 |
| Figura 28. Representación esquemática de las propiedades coloidales de agentes comerciales (Resovist) y la formulación de NP-PEG-(NH ₂) ₂ | 74 |
| Figura 29. Esquema general de trabajo en los ensayos de unión péptido-nanopartículas. | 76 |
| Figura 30. Cromatogramas obtenidos empleando HPLC-RP para una mezcla (1:1) de 40 µg de péptidos..... | 76 |
| Figura 31. Cuantificación del péptido libre en las fracciones del sobrenadante y lavado de los distintos ensayos de unión a las nanopartículas modificadas con DMSA y PEG. A-B) CIGB-300. C-D) CIGB-500. | 78 |
| Figura 32. Cuantificación del péptido libre en las fracciones del sobrenadante y lavado de los distintos ensayos de unión a las nanopartículas modificadas con DMSA y PEG en presencia de PBS y SDS. A-B) CIGB-300. C-D) CIGB-500..... | 79 |
| Figura 33. Esquema de los principales mecanismos endocíticos. (Adaptado de (Mercer et al., 2010)). | 82 |
| Figura 34. Métodos más usados para describir posibles afectaciones de la viabilidad celular asociada a una interacción célula-nanopartícula. | 84 |
| Figura 35. Internalización de las nanopartículas en células HeLa (A: control, B: NP-DMSA, C: NP-PEG-(NH ₂) ₂) y Pan02 (D: control, E: NP-DMSA, F: NP-PEG-(NH ₂) ₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 µm. | 90 |
| Figura 36. Tinción con azul de Prusia de las células HeLa (A: control, B: NP-DMSA, C: NP-PEG-(NH ₂) ₂) y Pan02 (D: control, E: NP-DMSA, F: NP-PEG-(NH ₂) ₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 µm. | 91 |
| Figura 37. Co-localización de las NP-DMSA con la sonda fluorescente LysoTracker Red en células Pan02. Tras el marcaje las células (30 min) se observaron mediante microscopía de campo claro para visualizar las células y las nanopartículas, y de fluorescencia para visualizar el marcaje. Barra de escala: 10 µm. | 92 |
| Figura 38. Tinción con azul de Prusia de las células HeLa (A: NP-DMSA, B: NP-PEG-NH ₂ , C: NP-PEG-(NH ₂) ₂ , D: NP-PEG-Prop-(NH ₂) ₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 µm. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Figura 39. Análisis de la citotoxicidad mediante un ensayo de MTT de las nanopartículas incubadas durante 24 h a 0,3 mg/mL de hierro en diferentes líneas celulares (A: HeLa, B: Pan02 y C: HepG2) NP-DMSA (■) y NP-PEG-(NH ₂) ₂ (■). Los datos representan las medias ± D.E. (n=6) del porcentaje de células viables, tomando como control (100%) de las células sin tratar (□). | 94 |
| Figura 40. Análisis de la viabilidad celular en tiempo real de células incubadas a distintas concentraciones de nanopartículas. A) MCF-10, B) MCF-7. | 95 |
| Figura 41. Diagrama simplificado de la cascada de coagulación que muestra la intersección de las vías intrínseca y extrínseca. (Adaptado de (Vogler and Siedlecki, 2009)). | 96 |
| Figura 42. Influencia de las nanopartículas en: A) Los tiempos de protrombina (PT), B) Tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos. Los valores representan la media ± D.E. (n=6 para las NPs y PBS [■], n=12 para los controles [□]), Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con p < 0.05 entre las muestras tratadas con nanopartículas, PBS y el control. NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH ₂) ₂ [■]. | 98 |
| Figura 43. Influencia de componentes del recubrimiento en su forma libre sobre: A) Tiempos de protrombina (PT), B) de tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos, C) Fibrinógeno en mg/dL. Los valores representan la media ± D.E. (n=6) Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con p < 0.05 entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH ₂) ₂ [■]. | 98 |
| Figura 44. Influencia de las nanopartículas sobre diferentes parámetros hematológicos: eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas Los valores representan la media ± D.E. (n=6) Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con p < 0.05 entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH ₂) ₂ [■]. | 99 |
| Figura 45. Influencia de las nanopartículas sobre diferentes parámetros hematológicos evaluados en ratas Wistar a las que se les administró una dosis de 2,5 mg Fe/ kg de peso corporal: eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas. Los valores representan la media ± D.E. (n=4) Prueba de Dunnett, (*) existen diferencias significativas con p < 0.05 entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [◇], NP-DMSA [●], NP-PEG-(NH ₂) ₂ [■]. | 100 |
| Figura 46. Ensayo de Cometa para muestras de sangre procedentes de ratas Wistar a las que se les administró una dosis de 2,5 mg Fe/ kg de peso corporal. A) Clasificación de los niveles de daños según (Jałoszyński et al., 1997). B) Porcentaje de daño total observado en los diferentes tratamientos. Prueba de Dunnett, (*) existen diferencias significativas | |

con $p < 0.05$ entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH₂)₂ [■]..... 103

Figura 47. Comportamiento magnético de los distintos componentes de un órgano, incluyendo la presencia de nanopartículas magnéticas (superparamagnético), hierro endógeno (paramagnético) y tejido (diamagnético). 107

Figura 48. Permanencia de las nanopartículas en sangre después de una administración intravenosa de 0,5 mg/kg de peso del animal. A-B) Ratas Wistar (n=4), C-D) Conejos Nueva Zelanda (n=1). Los valores representan la media \pm D.E. La línea de puntos representa el contenido basal de hierro ([●] NP-DMSA, [■] NP-PEG-(NH₂)₂). 109

Figura 49. Detección mediante tinción de Perls de las nanopartículas magnéticas acumuladas en diferentes órganos. A) Hígado Control 30 días, B) Hígado NP-DMSA 30 días, C) Hígado NP-DMSA 24 h, D) Hígado Control 24 h, E) Hígado NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días, F) Hígado NP-PEG-(NH₂)₂ 24 h, G) Pulmón Control 24 h, H) Pulmón NP-DMSA 24 h, I) Pulmón NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días, J) Bazo Control 7 días, K) Bazo NP-DMSA 15 días, L) Bazo NP-PEG-(NH₂)₂ 15 días, M) Riñón Control 24h, N) Riñón NP-DMSA 24h, Ñ) Riñón NP-PEG-(NH₂)₂ 24h. Los posibles agregados de nanopartículas se muestran encerrados en un círculo en cada caso. 113

Figura 50. Detección de hierro en diferentes órganos mediante análisis elemental. A-C) Hierro detectado en diferentes fracciones de los órganos extraídos a las 3 h después de la inyección de nanopartículas. D-F). Hierro total detectado en los órganos. Control (□), NP-DMSA (■), NP-PEG-(NH₂)₂ (■). Los datos se muestran como media \pm D.E. (n=4). Prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; NS: no existen diferencias significativas entre las muestras. 115

Figura 51. Detección y cuantificación de las nanopartículas magnéticas en diferentes órganos mediante medidas de magnetización. A) Curva de magnetización de una muestra patrón de las nanopartículas de 12 nm necesaria para el cálculo de la cantidad de nanopartículas presentes en cada órgano analizado (Patrón [■]). B-E) Curvas de magnetización de muestras liofilizadas de hígado y pulmones procedentes de ratas a las que se les administraron diferentes dosis de nanopartículas. F-G) Cuantificación de las nanopartículas presentes en los órganos analizados (n=4) NP-DMSA 0,45 mg/kg (■), NP-DMSA 2,5 mg/kg (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 0,45 mg/kg (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 2,5 mg/kg (■). Prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer, * $p < 0,05$; NS: no existen diferencias significativas entre las muestras 117

Figura 52. Análisis de las fracciones de nanopartículas detectadas mediante medidas de magnetización en los órganos colectados en diferentes intervalos de tiempo. NP-DMSA (■), NP-PEG-(NH₂)₂ (■). 119

Figura 53. Esquema cualitativo de las señales típicas obtenidas en tejidos biológicos después de un tratamiento con nanopartículas magnéticas en función de la temperatura. Primera columna: Susceptibilidad en fase. Segunda columna: Susceptibilidad fuera de fase. Tercera columna: Medidas de magnetización realizadas a la temperatura que indican las flechas rojas. (Adaptado de (Gutiérrez et al., 2013)). 120

Figura 54. Susceptibilidad magnética a diferentes temperaturas de muestras liofilizadas de hígados y pulmones extraídos tras la administración de nanopartículas magnéticas. A-B) Control de NP-PEG-(NH₂)₂ (■), C-D) Muestras de hígado, E-F) Muestras de pulmón. NP-DMSA 24 h (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 24 h (■) y NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días (■). ... 122

Figura 55. A) esquema de la circulación hepática. B) Esquema de la dependencia temporal de la concentración de nanopartículas en el hígado. Se evidencian tres regiones que se corresponden con los procesos de absorción, residencia y excreción de las nanopartículas. Las pendientes de la curva en estas regiones son proporcionales a las velocidades con que ocurren los procesos. Los puntos de inflexión marcan los momentos iniciales de las etapas II y III. C-D) Detección mediante tinción de Perls de las nanopartículas magnéticas acumuladas en los hepatocitos alrededor de las venas centro lobulares hepáticas. 124

Figura 56. Imágenes de resonancia T₂ del hígado a diferentes intervalos de tiempo después de administradas las NP-PEG-(NH₂)₂ (5 mg/kg): t = 0 (A), t = 30 min (B), t = 288 h (C), y t = 528 h (D). 125

Figura 57. Dependencia temporal de la intensidad de la imagen T₂ determinada por la relación $I_0/(I_t - I_0)$ (n=4). A) Las curvas roja y azul se refieren a la concentración de las nanopartículas en dos zonas (1 y 2) de igual área del hígado. La curva malva refleja la intensidad de la imagen en el área de tejido muscular. B) Curvas cinéticas para dos concentraciones de nanopartículas (azul: 5 mg/kg, negra: 0,8 mg/kg). 127

Figura 58. Distribución del hierro en el organismo. 129

Figura 59. Cuantificación por ELISA de diferentes proteínas involucradas en el metabolismo del hierro en ratas Wistar después de la administración de las nanopartículas (dosis: 2,5 mg/kg) (n=4). La primera columna muestra los resultados obtenidos para DMT-1, la columna central para Ferroportina y la tercera columna para Ferritina. A-C) Hígado, D-F) Bazo y G-I) Riñones. NP-DMSA (●), NP-PEG-(NH₂)₂ (■). 130

Figura 60. Representación esquemática de las diferentes vías que pueden seguir las nanopartículas de óxido de hierro después de su inyección intravenosa. 132

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| acac | Acetilacetato |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ADX | Aminodextrano |
| Agr | Agarosa |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| APS | 3-aminopropiltriétoxissilano |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATG | Análisis termogravimétrico |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BSA | Suero de albúmina bovina |
| C | Constante de Curie |
| CBB | Comassie blue R-250 |
| CIGB300 | péptido con actividad antitumoral |
| CIGB500 | péptido con actividad antifibrótica |
| CO | Carbonilo |
| COOH | Carboxilo |
| D_{crit} | Tamaño del dominio magnético |
| D_h | Tamaño hidrodinámico |
| DLS | Dispersión dinámica de luz |
| DMSA | Ácido dimercaptosuccínico |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DMT-1 | Proteína transportadora de metales divalentes 1 |
| EDC | carbodiimida |
| EGFP | Proteína fluorescente verde |
| ELISA | Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas |
| FDA | Agencia norteamericana para la regulación de fármacos y alimentos |
| FTIR | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier |
| H | Campo aplicado |
| H_c | Campo coercitivo o coercitividad |
| ICP-OES | Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente |
| IFN | Interferón |
| ID | Índice de Daño |
| K | Grados Kelvin |
| k_B | Constante de Boltzmann |

LSL proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus*.
LSL₁₅₀ módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus*
M Magnetización de la muestra
M_R Magnetización remanente
MRI Adquisición de imágenes mediante Resonancia Magnética
M_S Magnetización de saturación
MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NH₂ Amino
NPM Nanopartícula magnética
°C Grados centígrados
Oe Oersted
ole Oleato
PBS Tampón fosfato salino
PDI Índice de polidispersidad
PEG Polietilenglicol
PM Peso molecular
Prop Propilenglicol
PT Tiempo de Protrombina
RMN Resonancia Magnética Nuclear
ROS Especies reactivas del oxígeno
rpm Revoluciones por minuto
SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
T₁ Tiempo de relajación longitudinal
T₂ Tiempo de relajación transversal
T_B Temperatura de bloqueo
TE Tiempo de eco
tE Tiempo de excreción
TEM Microscopía electrónica de transmisión
TEOS Tetraetoxiortosilicato
TR Tiempo de repetición
tR Tiempo de residencia
TTPa Tiempo de tromboplastina parcial activada
U_e Movilidad electroforética
VSM Magnetómetro de muestra vibrante
χ Susceptibilidad magnética
η Viscosidad

λ Longitud de onda

σ Grado de polidispersidad

τ_B Tiempo de relajación browniano

Capítulo 1. Introducción

- 1.1 Nanomedicina*
- 1.2 Nanopartículas magnéticas*
- 1.3 Aplicaciones en biomedicina*
- 1.4 Toxicidad*
- 1.5 Objetivos de trabajo*

Capítulo 1. Introducción

1.1. Nanomedicina

La nanotecnología se ha definido como la actividad científico-tecnológica involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos con al menos una de las dimensiones en la nanoescala (generalmente 1-100 nanómetros) (NNI, 2011). El desarrollo creciente de este campo, así como su inserción en las áreas de la salud y la medicina han dado lugar a la aparición de un nuevo subtermino: Nanomedicina. Esta tiene como objetivo el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades. Uno de los grandes retos en este proceso reside en el desarrollo de “nanoterapias”, que se puedan dirigir de forma selectiva a los tejidos y órganos enfermos, evitando así los efectos secundarios de los tratamientos actuales (Lechuga, 2011).

Las principales ventajas de la utilización de los nanomateriales en aplicaciones biomédicas son: i) Su escala de tamaño similar a biomoléculas, tales como receptores, anticuerpos y ácidos nucleicos (Figura 1). Los nanomateriales también derivatizados con biomoléculas pueden ser dirigidos hacia orgánulos específicos dentro de ciertos tejidos o incluso el movimiento de células enteras para la localización en determinado sitio diana. ii) Estas nanoestructuras a menudo pueden superar los problemas de solubilidad y estabilidad que presentan formulaciones tradicionales basadas en biomoléculas a través de procesos de modificación superficial. iii) Algunas nanoestructuras presentan nuevas propiedades físicas, tales como las propiedades ópticas en el caso de los quantum-dots, que se pueden utilizar como herramientas de imagen (Liu et al., 2013). iv) Debido al tamaño nanométrico, estos nanosistemas presentan una elevada relación área superficial/volumen y por tanto una gran capacidad de carga terapéutica útil en su superficie (isótopos radiactivos o fármacos de quimioterapia) que se puede dirigir o encapsular en dicha nanoestructura. Una vez en el sitio diana y reconocido por un receptor, la alta dosis de carga terapéutica puede causar un efecto mayor en el lugar de destino. v) Finalmente, estos sistemas nanoparticulados, a través de procesos de direccionalización pasiva o activa, pueden realizar el proceso de liberación del fármaco de

una forma mucho más controlada y reducir procesos de toxicidad y efectos adversos si se compara con formulaciones tradicionales (Wang et al., 2013).

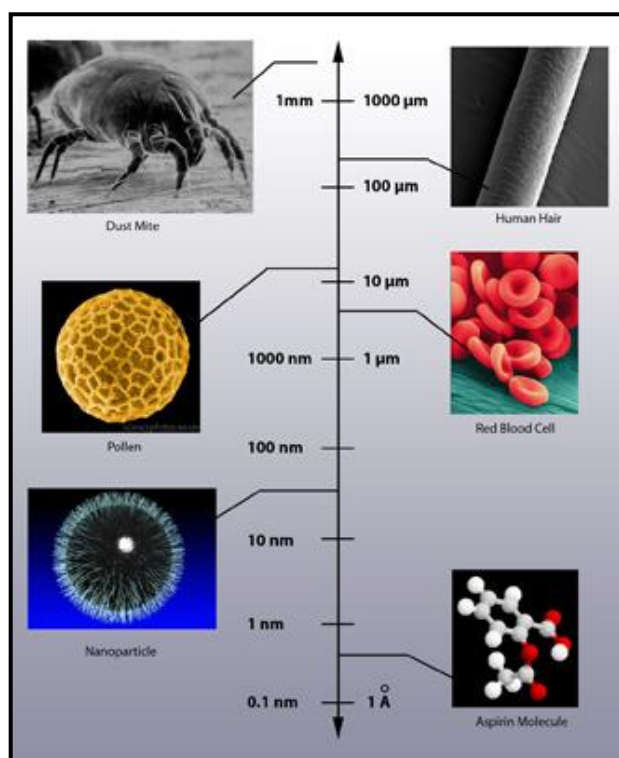


Figura 1. Tamaño relativo de los organismos y biomoléculas que pueden interactuar con las nanopartículas.

El campo de acción de herramientas nanotecnológicas aplicadas a biomedicina se ha dividido de forma general en tres grupos principales: el diagnóstico, la liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa. El nanodiagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas analíticos y de imagen para detectar una enfermedad en las etapas más tempranas posibles tanto *in vivo* como *in vitro*. La nanoterapia pretende dirigir sistemas de liberación de fármacos de forma activa que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios. La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas (Lechuga, 2011). En la Tabla 1 se resumen los principales productos aprobados por las agencias regulatorias para su uso en nanomedicina. Como se puede observar la mayoría son formulaciones cuyo principio activo es de origen orgánico, presumiblemente debido a su menor (o nula) toxicidad, en comparación con aquellos productos basados en plataformas inorgánicas (delaFuente and Grazú, 2012). También resulta interesante señalar que la mayoría son

productos terapéuticos, donde el nicho de mercado es mucho más amplio y rentable que para productos de diagnóstico (Wang et al., 2013).

Tabla 1. Formulaciones aprobadas por las diferentes agencias regulatorias.

| Producto | Nanosistema | Indicación | Status | Compañía |
|---|---|--|--|---|
| Doxil (Barenholz, 2012) | Doxorrubicina encapsulada en liposomas PEGilados | Cáncer de ovarios | Aprobado 11/17/1995 FDA50718 | Ortho Biotech (adquirida por JNJ) |
| Myocet (Waterhouse et al., 2001) | Doxorrubicina encapsulada en liposomas No PEGilados | Cáncer de mama metastásico | Aprobado en Europa y Canadá, en combinación con ciclofosfamida | Sopherion Therapeutics, LLC en América del Norte y Cephalon, Inc. en Europa |
| DaunoXome (Forssen, 1997) | Daunorrubicina encapsulada en liposomas | Tratamiento de sarcoma de Kaposi avanzado asociado al VIH | Aprobado en E.E.U.U | Galen Ltd. |
| ThermoDox (Dromi et al., 2007) | Doxorrubicina encapsulada en liposomas (liberación mediada por calor) | Cáncer de mama y primeras etapas de cáncer de hígado | Aprobación esperada para el año 2013 | Celsion |
| Abraxane (Guarneri et al., 2012) | Nanopartículas de albúmina-paclitaxel | Diferentes tipos de cáncer | Aprobado 1/7/2005 FDA21660 | Celgene |
| Rexin-G (Gordon and Hall, 2010) | MicroRNA-122 encapsulado en liposomas | Sarcoma, osteosarcoma, cáncer de páncreas, y otros tumores sólidos | Aprobado en Filipinas, Fase II y III en E.E.U.U | Epeius Biotechnologies Corp. |
| Oncaspar (Avramis and Tiwari, 2006) | Asparaginasa PEGilada | Leucemia linfoblástica aguda | Aprobado 24/06/2006 | Enzon Pharmaceuticals, Inc. |
| Resovist (Hamm et al., 1994) | Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de carboxidextrano | Agentes de contraste para hígado y bazo | Aprobado en Europa en 2001 | Bayer Schering Pharma AG |
| Feridex (Weissleder et al., 1989) | Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano | Agentes de contraste para hígado y bazo | Aprobado por la FDA en E.E.U.U en 1996 | Berlex Laboratories |
| Endorem (Weissleder et al., 1989) | Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano | Agentes de contraste para hígado y bazo | Aprobado en Europa | Guerbet |

1.2. Nanopartículas magnéticas

Uno de los sistemas más prometedores dentro del campo de materiales lo constituyen las nanopartículas magnéticas (NPM). Su principal ventaja es la posibilidad de manipulación bajo la influencia de un campo magnético externo. El desarrollo de las nanopartículas se ha dividido en numerosos campos de interés de acuerdo a la notable diferencia de materiales, métodos y aplicaciones. Debido a sus características químico-físicas, así como sus propiedades magnéticas, las NPM presentan una amplia gama de aplicaciones en sistemas de almacenamiento de datos, tintas de impresión, sellos magnéticos, como sistemas de refrigeración magnética, altavoces, en biotecnología, biomedicina y estudios medioambientales (Leslie-Pelecky and Rieke, 1996).

Las primeras nanopartículas preparadas como fluidos magnéticos estables se obtuvieron a inicios de la década de 1960 (Rosensweig, 1982). Durante esos años también se observó que diferentes organismos eran capaces de sintetizar nanopartículas de magnetita de forma natural. En 1962 Lowenstan encontró la presencia de este tipo de partículas en la rádula de moluscos marinos (clase *Polyplacophora*) (Lowenstan, 1962). Posteriormente en 1975 Blakemore describió la bacteria magnetotáctica. Esta bacteria Gram-negativa es capaz de sintetizar intracelularmente nanopartículas de magnetita y greigita recubiertas de fosfolípidos que forman una estructura vacuolar denominada magnetosomas. Estas nanopartículas las emplea como una especie de brújula natural que le permite orientarse con el campo magnético de la tierra en busca de zonas microaerófilas (Blakemore, 1975). En 1981, Massart describió el método de obtención de nanopartículas mediante coprecipitación de dos sales en medio acuoso (Massart, 1981) y desde entonces se ha continuado el estudio de los métodos de obtención de este tipo de nanomateriales, así como sus características físico-químicas y propiedades magnéticas.

Las NPM están formadas generalmente por elementos magnéticos como el hierro, níquel, cobalto, y sus respectivos óxidos. Dependiendo de las propiedades del material presentan un amplio campo de aplicaciones industriales como ya ha sido mencionado. Por ejemplo, en el caso de NPM aplicadas en sistemas de almacenamiento de datos que emplean sistemas de grabación magnética se hace necesario que las partículas presenten un estado magnético estable y a su vez modificable, capaz de representar los bits de información que se desean almacenar. Para su empleo como medio de grabación, un material magnético debe presentar valores de magnetización de saturación (M_s) lo suficientemente altos y de la cuadratura de la curva de histéresis ($S_q = M_r/M_s$ donde M_r = magnetización remanente) para mantener una fracción substancial de su magnetización

cuando el campo magnético externo es eliminado, con el fin de disponer de un flujo magnético adecuado para el cabezal de lectura (Apéndice I). Además, debe poseer un valor de coercitividad (H_c) (Apéndice I) suficientemente elevado para evitar la degradación de la señal almacenada. Sin embargo, estos valores de H_c no deben ser excesivamente elevados como para impedir sucesivas escrituras o borrados por los cabezales del sistema de grabación (Sharrock, 1989).

Por otra parte en aplicaciones dentro del campo de la biomedicina es necesario que las nanopartículas presenten un carácter superparamagnético donde no exista magnetización remanente una vez que se retira el campo magnético (Colombo et al., 2012). Las NPM sólo se “transforman” en magnéticas en presencia de un imán externo y retornan a su estado no magnético al retirar este. Esto evita la presencia de un momento magnético neto en las nanopartículas en ausencia de campo magnético. Sin embargo, al ser administradas *in vivo*, las partículas pueden ser manipuladas aplicando un campo magnético externo, lo cual constituye una gran ventaja en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de medicamentos. Lo ideal sería tener nanopartículas superparamagnéticas con la máxima imanación de saturación. Sin embargo estas partículas son más difíciles de estabilizar coloidalmente debido a las fuertes interacciones magnéticas entre partículas.

1.3. Aplicaciones biomédicas

En la última década del siglo XX, comienza la aplicación en seres humanos de productos basados en NPM de óxido de hierro. El hierro como material presenta ventajas significativas para su uso en biomedicina: puede ser metabolizado por el organismo, la superficie de las NPM de óxido de hierro puede ser modificada para unir biomoléculas de interés, las partículas posean un elevado momento magnético y pueden ser manipuladas con un imán externo puesto que las líneas de campo pueden atravesar el cuerpo humano (Huber, 2005; Laurent et al., 2008; Pankhurst et al., 2003). En la actualidad, los estudios que involucran el uso de nanopartículas magnéticas aplicadas a la biomedicina se encuentran dirigidos al desarrollo de agentes teranósticos. Este tipo de nanopartículas multifuncionales permitiría combinar en una única formulación propiedades de diagnóstico y terapéuticas (Ferrari, 2005; Shubayev et al., 2009). Aplicadas a la terapia del cáncer, estos sistemas presentan grandes ventajas respecto a las terapias tradicionales de quimio y radioterapia. Se podría realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, el

seguimiento y visualización en tiempo real del tratamiento y sus efectos por RMN, así como reducir la toxicidad, efectos adversos y acortar el tiempo de tratamiento a través de una administración local del fármaco (Rahman et al., 2012).

Las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas pueden clasificarse como *in vitro* e *in vivo*. El principal uso en aplicaciones *in vitro* está dirigido hacia el desarrollo de sistemas de nanodiagnóstico (Lai et al., 2009; Lee et al., 2011). Este tipo de sistemas ofrece una gran flexibilidad de diseño, ya que se puede aplicar a muestras muy reducidas de fluidos corporales o de tejidos, a partir de los cuales se puede llevar a cabo una detección específica en tiempos muy cortos, con gran precisión y sensibilidad (Chou et al., 2011). Dentro de los sistemas de aplicación *in vitro* de las nanopartículas en biomedicina podemos encontrar también numerosos trabajos relacionados con la inmovilización o recuperación de enzimas como biocatalizadores (Aguilar-Arteaga et al., 2010), así como el empleo de nanopartículas de óxido de hierro para marcaje celular como herramienta de diagnóstico (Cui et al., 2011).

Las aplicaciones *in vivo* de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro se encuentran divididas en dos grupos fundamentales: herramientas de diagnóstico (agentes de contraste para resonancia magnética nuclear (Rosen et al., 2012)) o aplicaciones terapéuticas (Hipertermia (Wust et al., 2002) y liberación controlada de fármacos (Arruebo et al., 2007)). Sin embargo, existen determinados factores que condicionan el uso de nanopartículas magnéticas para aplicaciones *in vivo*: el tamaño de partícula, tipo de recubrimiento superficial y las propiedades magnéticas. El tamaño es un parámetro que influye de manera directa en el comportamiento *in vivo* de las nanopartículas ya que condiciona su farmacocinética y biodistribución en los tejidos. Las nanopartículas de tamaños cercanos a los 200 nm se acumulan rápidamente en el hígado donde son detectadas por macrófagos y eliminadas por el sistema retículo endotelial, mientras que partículas muy pequeñas son inmediatamente filtradas por el riñón (Berry, 2009). Si disminuye el tamaño de partícula se observa que aumenta su tiempo de vida media en sangre. Bajo condiciones fisiológicas normales partículas ~10 nm no podrían atravesar el endotelio, sin embargo, en el caso de enfermedades como procesos inflamatorios o infiltración tumoral, la permeabilidad de los tejidos aumenta y admite el paso de partículas de hasta 700 nm (Neuberger et al., 2005). Para nanopartículas de 30-100 nm administradas intravenosamente, las de mayor tamaño son rápidamente filtradas por los sinusoides hepáticos y solo las más pequeñas presentan un mayor tiempo de vida media en sangre (Chouly et al., 1996). Por otra parte, partículas demasiado pequeñas (~4 nm) presentan un mejor perfil farmacocinético, pero se ven afectadas sus propiedades magnéticas debido a efectos de superficie (Roca et al., 2007; Roca et al., 2006). Existe por

tanto un intervalo de tamaño 8-15 nm “preferible” cuando se busca una aplicación biomédica de las nanopartículas de óxido de hierro y este es el rango de tamaño seleccionado en este trabajo (Figura 2).

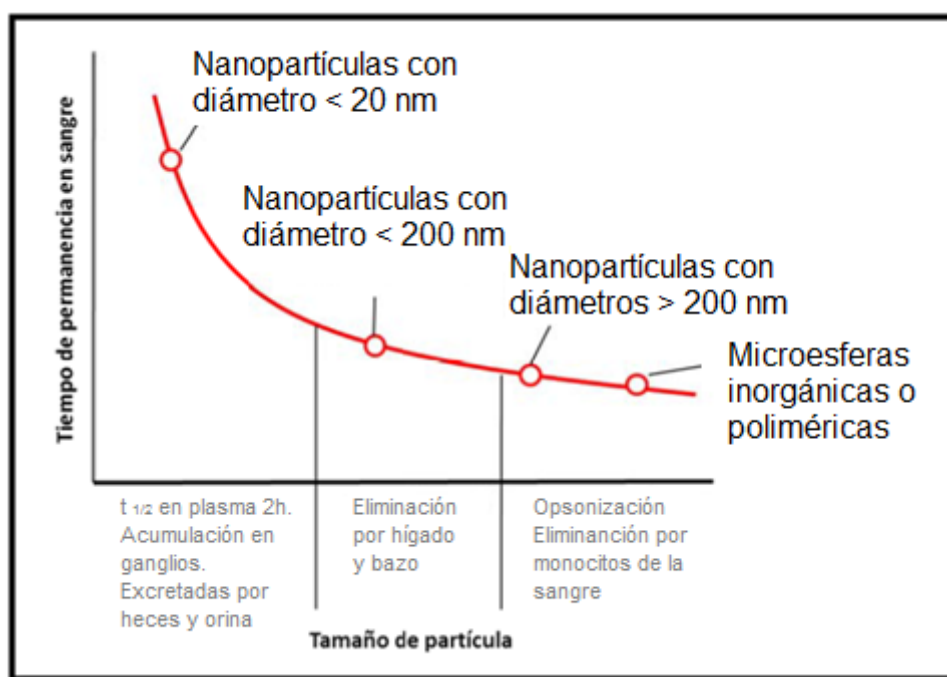


Figura 2. Esquema cualitativo del tiempo de permanencia en sangre de las nanopartículas en función del tamaño (Adaptado de (Arruebo et al., 2007)).

Otro parámetro que condiciona el comportamiento de las nanopartículas magnéticas *in vivo* es el recubrimiento superficial. La estabilización de las nanopartículas en una suspensión coloidal está dada por el impedimento estérico o la repulsión electrostática que aporta el recubrimiento para contrarrestar las fuerzas atractivas entre las nanopartículas debidas a fuerzas de Van der Waals e interacciones magnéticas (Laurent et al., 2008). De forma general, se ha observado que la carga superficial que le confiere el recubrimiento a las nanopartículas va a determinar su biodistribución *in vivo*, así como su patrón de internalización celular *in vitro* (Reddy et al., 2012). Hay numerosas moléculas que se han empleado para el recubrimiento y funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro dirigidas a posibles aplicaciones biomédicas (Hao et al., 2010; Laurent and Mahmoudi, 2011). Son muy frecuentes las estrategias basadas en la modificación superficial con pequeñas moléculas bifuncionales como pueden ser el DMSA (Roca et al., 2009), la dopamina (Xie et al., 2007), o moléculas con grupos silanos que en general se unen fuertemente a la superficie de óxido de hierro (DePalma et al., 2007). Otra forma de aumentar la estabilidad coloidal y mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas es mediante estrategias de recubrimiento polimérico (Amstad et al., 2009;

Laurent et al., 2008; Xie et al., 2007) o encapsulación en liposomas (Dubertret et al., 2002). Algunos polímeros como el el polivinilalcohol (PVA) y el quitosano son utilizados ya que proporcionan una superficie biocompatible e hidrofílica. Los polímeros más empleados son el dextrano y el polietilenglicol ya que aumentan la biocompatibilidad de las nanopartículas, además de reducir su inmunogenicidad y toxicidad (Moros et al., 2012). En particular el PEG es el polímero seleccionado en este trabajo y uno de los retos es el recubrimiento de partículas magnéticas con PEG siguiendo una estrategia que permita la unión del polímero fuertemente a la superficie de la partícula evitando la agregación.

1.4. Toxicidad

Existen determinados aspectos a tener en cuenta antes de aprobar el uso de nanopartículas con fines biomédicos: (i) biocompatibilidad, (ii) biodegradabilidad, (iii) mantenimiento de las propiedades físicas después de procesos de modificación superficial, (iv) no debe afectar a las características de células madre, (v) eficaces a dosis terapéuticas, (vi) mínima o ninguna transferencia de los subproductos a células o tejidos adyacentes sanos, (vii) químicamente estables en condiciones fisiológicas .

Las características químico-físicas del material determinan su interacción con las diferentes entidades biológicas y por tanto, su citotoxicidad. Se ha observado que el hierro es un material mucho menos tóxico si se compara con otros como el níquel, cobalto, cadmio o la plata (Berry, 2005). Estudios de interacción células-nanopartículas demuestran que este proceso puede afectar la viabilidad celular. Por ejemplo, la internalización de nanopartículas de CdSe y liberación de iones cadmio en el citosol de hepatocitos primarios provoca muerte celular (Derfus et al., 2004), mientras que la adhesión de nanopartículas a la membrana de células madres puede interferir en la adhesión celular a la superficie (Solanki et al., 2008). Por otra parte la degradación de las nanopartículas en la célula, puede traer como consecuencia la creación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos radicales provocan daño celular a partir de la degradación de proteínas, lípidos, enzimas y ácidos nucleicos lo que conduce a procesos de necrosis o apoptosis (Mahmoudi et al., 2012).

Con el impacto de la nanotecnología en áreas de biomedicina se hace cada vez más necesaria la profundización en estudios asociados a la toxicidad de estos materiales, y más importante aún la estandarización de dichos estudios. Generalmente estos comienzan con una fase *in vitro* ya que estos ensayos permiten una aproximación bastante rápida,

económica y ética a datos preliminares de toxicidad celular. Los ensayos más comunes son el MTT, azul tripán e ioduro de propidio para determinar relación de células vivas/muertas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que de existir citotoxicidad estos ensayos no brindan prácticamente información acerca del mecanismo de toxicidad inducido por las nanopartículas (Markides et al., 2012).

A pesar del costo, tiempo que conlleva y las consideraciones éticas, se hacen necesarios también estudios toxicológicos en modelos *in vivo*. Esto incluye ensayos de farmacocinética, biodistribución, absorción, metabolismo y excreción. Esta información permitiría conocer las posibles consecuencias inmunológicas, neurológicas, reproductivas, cardiovasculares y si presentan posible actividad carcinogénica, debido a la administración de NPM. Entre los aspectos más importantes a estudiar está la biocompatibilidad de las nanopartículas en sangre, su estabilidad y efectos en el proceso de coagulación (Ali et al., 2013). También resulta de vital importancia el estudio de la respuesta inflamatoria del organismo, así como el análisis de la expresión genética de factores relacionados con el estrés oxidativo.

En realidad el campo de las nanopartículas magnéticas aplicadas a la biomedicina muestra un enorme portafolio de productos en fase de investigación o en diferentes etapas de ensayos clínicos. Su diversidad hace imposible responder de forma categórica si las NPM resultan tóxicas o no. Cada caso debe ser evaluado puntual y exhaustivamente.

1.5. Objetivos del trabajo

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de una *plataforma basada en nanopartículas magnéticas para diferentes aplicaciones biotecnológicas*. Con este propósito se desarrollaron dos tipos de nanopartículas: por una parte, nanopartículas recubiertas de agarosa y por otra, nanopartículas recubiertas con polietilenglicol (Figura 3). En los Capítulos 1 y 2 se recogen los antecedentes del tema y la parte experimental (Materiales y Metodo) más relevante del trabajo realizado en esta memoria.

Como objetivos específicos se definen:

- i) *Síntetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de hierro por dos métodos diferentes (Capítulo 3 y 4).*

En el Capítulo 3 se aborda la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro vía coprecipitación, así como dos estrategias de recubrimiento con agarosa

para su aplicación como soporte de inmovilización de lectinas. La inmovilización de esta proteína permitirá el diseño de un sistema de purificación magnética de proteínas de fusión. El uso de este método de síntesis permite la obtención de grandes cantidades de nanopartículas y su recubrimiento con agarosa garantiza una interacción bio-específica con el dominio lectina de la proteína de fusión.

En el Capítulo 4 se describe la síntesis de nanopartículas por descomposición en medio orgánico dirigidas a aplicaciones biomédicas, ya sea como agentes de contraste para imagen por Resonancia Magnética Nuclear o como plataforma para la liberación de fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades. En este capítulo se ha desarrollado una estrategia de modificación superficial con polietilenglicol mediante la unión covalente del polímero a las nanopartículas recubiertas con DMSA y se ha estudiado la unión a dos péptido bioactivos: CIGB300 y CIGB500 con vistas al tratamiento de diferentes enfermedades. Este método de síntesis permite la obtención de nanopartículas muy homogéneas y con excelentes propiedades magnéticas. El recubrimiento con PEG permitirá aumentar la biocompatibilidad de las mismas, así como aumentar el tiempo de residencia en sangre y retardar los procesos de degradación.

- ii) *Evaluar la toxicidad asociada a las nanopartículas de óxido de hierro en función del recubrimiento (Capítulo 5).*

Estudio de la citotoxicidad asociada a las nanopartículas recubiertas con DMSA y PEG mediante diferentes métodos, así como su posible daño genotóxico o su influencia sobre diferentes parámetros hematológicos.

- iii) *Caracterizar el proceso de farmacocinética y biodistribución de las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG (Capítulo 6).*

Estudio del perfil farmacocinético de las nanopartículas recubiertas con DMSA, influencia que tiene el recubrimiento con PEG en el tiempo de residencia en sangre de las mismas en diferentes modelos animales. Mediante la combinación de métodos magnéticos y no magnéticos se determinará la biodistribución de las nanopartículas, así como su proceso de degradación y la influencia de las mismas en distintos puntos de la ruta metabólica del hierro.

Finalmente, el Capítulo 7 recoge las principales conclusiones de este trabajo. Se han incluido en la memoria dos apéndices incluyendo nociones básicas de magnetismo y de las

técnicas experimentales más específicas de este trabajo, y una lista de abreviaturas para facilitar la lectura de la memoria.

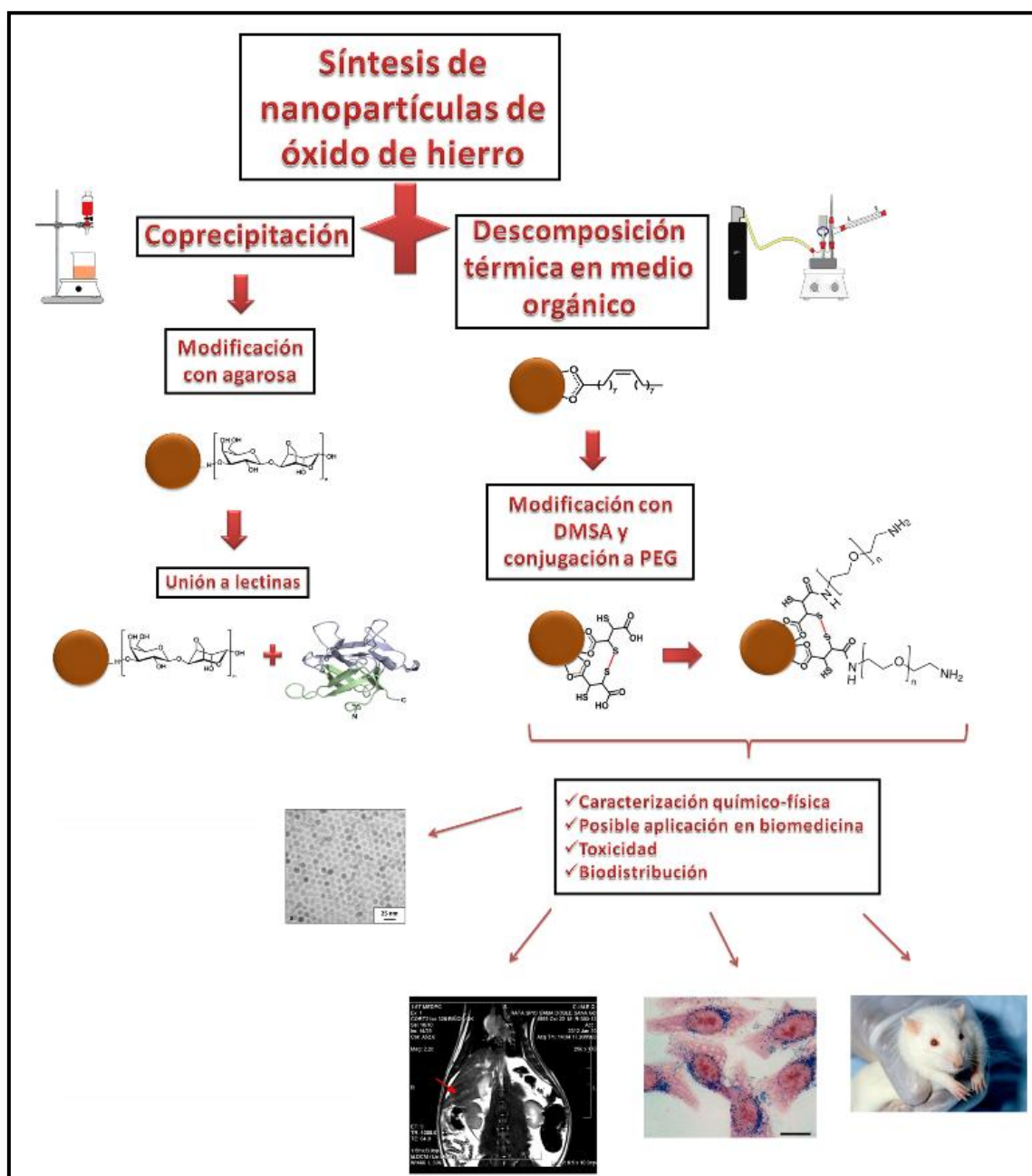


Figura 3. Objetivos del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

- 2.1 *Óxidos de hierro*
- 2.2 *Métodos de síntesis de partículas uniformes*
- 2.3 *Modificación superficial*
- 2.4 *Funcionalización con diferentes moléculas bioactivas*
- 2.5 *Caracterización*

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Óxidos de hierro

Entre las nanopartículas magnéticas capaces de formar ferrofluidos con propiedades superparamagnéticas encontramos aquellas de metales y óxidos de Ni, Co, Fe. Sin embargo, el hierro muestra grandes ventajas como “material funcional ideal” (Tartaj et al., 2011): i) Se encuentra abundantemente distribuido en la naturaleza, ii) los procesos de síntesis en el laboratorio son relativamente sencillos para la obtención de nanopartículas con un buen control del tamaño y la forma además de la posibilidad de funcionalizar su superficie, iii) presentan gran variedad de propiedades electrónicas y magnéticas debido a su polimorfismo, iv) posibilidad de manipulación mediante un campo magnético externo con niveles de magnetización aceptables y suficientes y bajo campo coercitivo, y finalmente y muy importante con vistas a aplicaciones biomédicas v) poseen muy baja toxicidad (Figura 4).

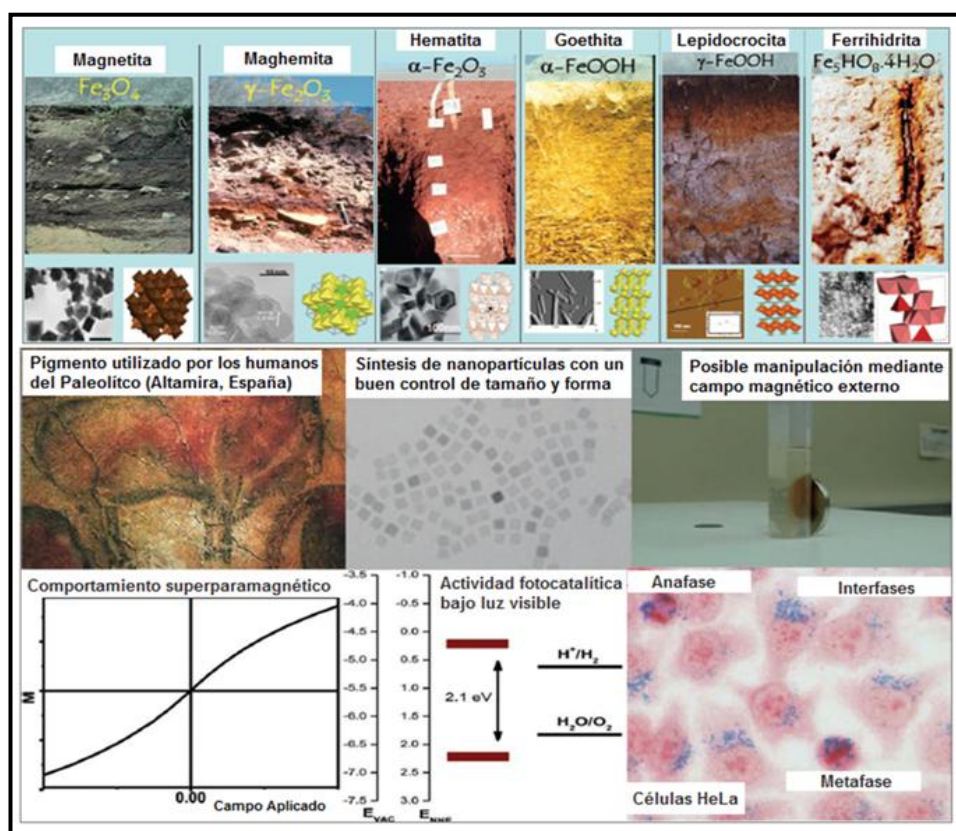


Figura 4. Polimorfismo del hierro y versatilidad del material en diferentes aplicaciones (Adaptado de (Tartaj et al., 2011))

2.2. Métodos de síntesis de partículas uniformes

Las investigaciones sobre la síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro abarcan una gran variedad de métodos. De forma general se prefieren métodos en los que se pueda obtener un exhaustivo control sobre las propiedades microestructurales y con la forma y tamaño deseados ya que cada aplicación requiere materiales con unas determinadas características.

Uno de los factores a controlar durante la síntesis es que las partículas sean lo más uniformes posibles, con una distribución de tamaños estrecha. Para ello, independientemente del método utilizado, el proceso de síntesis de nanopartículas debe separarse en dos etapas, nucleación y crecimiento (LaMer and Dinegar, 1950). Para obtener partículas uniformes estas etapas deben estar diferenciadas entre sí, y la etapa de nucleación debe ser única generándose todos los núcleos al unísono. Las nanopartículas de óxido de hierro ferrimagnéticos (Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) con aplicaciones dentro del campo de la biomedicina pueden ser sintetizadas por varios métodos tanto en fase líquida (coprecipitación en medio acuoso, microemulsiones, síntesis hidrotermal y descomposición en medio orgánico) como en fase aerosol o gaseosa (aerosol pirólisis y pirólisis láser) (Laurent et al., 2008; Lu et al., 2007). En la Tabla 2 se resumen las principales características, ventajas y desventajas de dichos métodos de síntesis.

Tabla 2. Resumen de preparación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro.

| Método | Características | Ventajas/Desventajas |
|-----------------|--|---|
| Coprecipitación | Consiste en la adición de una disolución de sal de Fe^{2+} y otra de Fe^{3+} en medio básico (Massart, 1981). | Ventajas : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Simplicidad ✓ Bajo coste ✓ Escalabilidad ✓ Tamaños entre 2-15nm Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gran número de variables. ✓ Amplia distribución de tamaños |
| | Consiste en la dispersión y estabilización con surfactantes de pequeñas gotas de agua de tamaños nanométricos en aceite. Estas gotas de agua actúan como microreactores donde tienen lugar las reacciones de síntesis para la producción de partículas. El tamaño de las partículas viene controlado por el tamaño de las gotas, que a su vez viene controlado | Ventajas : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Se evita la formación de agregados. Desventajas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Tamaño y morfología poco uniformes. ✓ Dificultad de escalado (se requieren grandes volúmenes de aceite para obtener partículas muy |

| | | |
|---|---|--|
| | <p>por la relación agua:surfactante (Santra et al., 2001).</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ pequeñas) ✓ Presencia de surfactantes |
| Descomposición en medio orgánico | <p>Consiste en la descomposición de un precursor orgánico de hierro a elevadas temperaturas que se lleva a cabo en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición y en presencia de surfactantes (Hyeon et al., 2001).</p> | <p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Las partículas son muy uniformes, estables y cristalinas. ✓ Control del tamaño entre 4-30 nm. ✓ La capa de surfactante que rodea las nanopartículas evita su agregación. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto uso de disolventes orgánicos (contaminación y alto coste). ✓ Pequeñas cantidades de producto. ✓ Nanopartículas protegidas con una capa de surfactante incompatible con determinadas aplicaciones (biomedicina). |
| Aerosol pirólisis | <p>Consiste en la descomposición de pequeñas gotas de un aerosol que es transportado por un gas portador al interior de un horno tubular horizontal (200-1000 °C) (Tartaj et al., 2004).</p> | <p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta homogeneidad en composición. ✓ Posibilidad de funcionalización superficial. ✓ Alta estabilidad. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ La morfología puede variar (no siempre se obtienen esferas). ✓ Amplia distribución de tamaño entre 6-60nm. |
| Pirólisis láser | <p>Consiste en la aplicación de un haz láser a una mezcla de gases/aerosoles entre las que se encuentran el precursor de hierro, generando los núcleos de las partículas que luego son transportadas a un colector (Cannon et al., 1982).</p> | <p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Escasa agregación de las partículas debido al corto tiempo de reacción. ✓ Tamaños entre 2-9 nm. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto coste. ✓ Impurezas de carbón. |
| Síntesis hidrotermal | <p>Consiste en la hidrólisis y oxidación de sales de hierro en medio acuoso a alta presión (2000 psi) y alta temperatura (200 °C) (Zheng et al., 2006).</p> | <p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Buen control de tamaño y forma. ✓ Altos rendimientos. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Se requieren pasos adicionales para obtener las nanopartículas estables en agua. |

Teniendo en cuenta que los objetivos de este trabajo se encuentran dirigidos hacia la preparación de nanopartículas magnéticas con posibles aplicaciones biotecnológicas se han seleccionado dos métodos de síntesis: Coprecipitación y Descomposición en medio orgánico. En el primer caso por producir materiales a gran escala, ideales para aplicaciones *in vitro*, y en el segundo caso por producir materiales de alta calidad en cuanto a uniformidad de partículas y propiedades magnéticas, ideales para aplicaciones *in vivo*.

2.2.1. Coprecipitación

La coprecipitación es el método más utilizado para la síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Hoy en día, los principales productos basados en nanopartículas magnéticas diseñados para aplicaciones biológicas se obtienen con esta metodología, ya que sus principales ventajas son la simplicidad y bajo coste del proceso. Este método consiste en la adición de una disolución de sal de Fe^{2+} y otra de Fe^{3+} , sobre una solución básica (Massart, 1981). Sin embargo, la principal dificultad que presenta este método en la obtención de nanopartículas es el ajuste del tamaño medio de partícula y el control de la polidispersidad de la muestra (normalmente $>30\%$), lo que va en detrimento de sus propiedades magnéticas.

Se han estudiado diferentes variantes que permiten obtener una distribución de tamaño más controlada (entre 5 y 15 nm). El ajuste de parámetros como el pH de la reacción, velocidad de agitación, velocidad de adición de las sales de hierro, temperatura y fuerza iónica permiten un mejor control del tamaño de nanopartícula (Lee et al., 2007; Si et al., 2004).

2.2.2. Descomposición en medio orgánico

Como se ha mencionado anteriormente, existe un intervalo de tamaño 8-15 nm “preferible” cuando se busca una aplicación biomédica de las nanopartículas de óxido de hierro. El método de descomposición térmica en medio orgánico permite no solo la obtención de nanopartículas de estos tamaños sino que es posible controlar la polidispersidad de la muestra ($\sim 10\%$), lo cual es un parámetro de gran importancia en biomedicina (Salas et al., 2012; Sun et al., 2004).

A partir de la década de los '90 se desarrolló una metodología que tenía como características el empleo de precursores orgánicos de los átomos que componían las partículas y que se llevaba a cabo en presencia de disolventes orgánicos de alto punto de ebullición y de surfactantes (Murray et al., 1993). Este método basa su fundamento en el mecanismo clásico de LaMer-Dinegar, donde se produce una corta etapa de nucleación a partir de una solución sobresaturada que es seguida por una etapa de crecimiento lento de partículas sin nucleación adicional significativa. Con este método se consigue una separación bien definida de las etapas de nucleación y crecimiento (LaMer and Dinegar, 1950). Este procedimiento ha sido empleado para la síntesis de nanopartículas monodispersas de CdSe semiconductoras (Murray et al., 1993) y materiales magnéticos, por ejemplo nanopartículas de óxido de hierro (Park et al., 2005).

El método de síntesis basado en la descomposición de un precursor orgánico de hierro a altas temperaturas en presencia de agentes tensoactivos y disolventes orgánicos es uno de los mejores métodos para producir nanopartículas magnéticas altamente monodispersas, con un control de tamaño en el intervalo entre 4 y 15 nm (Park et al., 2005). El protocolo más utilizado para la obtención de este tipo de nanopartículas es el descrito por Sun y colaboradores (Sun and Zeng, 2002). Este propone el uso de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (acac = acetilacetato) como precursor orgánico de hierro en presencia de ácido oleico, oleilamina y 1,2-hexadecanodiol (Sun and Zeng, 2002). La reacción se realiza en presencia de un solvente orgánico de elevado punto de ebullición como es el 1-octadeceno (Roca et al., 2009). El uso de precursores como el oleato de hierro, tiene como ventajas su bajo costo, altos rendimientos y la capacidad de obtener nanopartículas magnéticas ≥ 10 nm muy homogéneas, cristalinas y con excelentes propiedades magnéticas (Salas et al., 2012; Sun et al., 2004). Estas características son de vital importancia si se busca la aplicación de las nanopartículas en biomedicina, ya sea como agentes de contraste (Rosen et al., 2012), en hipertermia (Maier-Hauff et al., 2011; Wust et al., 2002) o como sistemas de liberación modificada de fármacos (Prijic and Sersa, 2011).

2.2.3. Sección Experimental

2.2.3.1. Síntesis de nanopartículas por coprecipitación

Para la obtención de las partículas por coprecipitación se emplearon disoluciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (43 mL, 27%) y 45 mL of $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10.8 g) en agua que se adicionaron

lentamente ($0.2 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$) a un medio alcalino a pH 13 (75 mL). Una vez adicionadas las disoluciones de las sales se agitó vigorosamente la mezcla de reacción. El tamaño de partícula se puede controlar a través de la velocidad de adición de las sales. Para la obtención de partículas pequeñas ($\leq 10 \text{ nm}$) estas se añadieron a una velocidad de 40 mL/s. La naturaleza de las bases empleadas también influye en el tamaño final de partícula, en este caso se utilizó KOH (25%) y NH_4OH (25%) para la obtención de las nanopartículas de 6 y 8 nm respectivamente. Para la obtención de partículas de 12 nm la velocidad de adición de las sales fue de 0,2 mL/s y la base utilizada fue NH_4OH (25%).

Para separar las partículas del medio se empleó un imán y decantó el sobrenadante. Este proceso se realizó 3 veces. Con el objetivo de oxidar la magnetita a maghemita se realizó un tratamiento ácido a las nanopartículas. Se añadieron 300 mL de HNO_3 (2M) y se mantuvo en agitación durante media hora. Posteriormente el ácido nítrico es eliminado y se añade una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (1 M) y 130 mL de agua. La muestra fue calentada hasta ebullición durante 30 minutos. Las partículas se dejan enfriar a temperatura ambiente y se realiza un nuevo tratamiento ácido por 15 minutos. Finalmente se lavan 3 veces con acetona y se redispersan en agua destilada (delaPresa et al., 2012; Ewijk et al., 1999).

2.2.3.2. Síntesis de nanopartículas por descomposición en medio orgánico

Para el montaje experimental se ha empleado una manta calefactora con regulación de energía para matraces de 500 mL, un matraz reactor esférico de 3 bocas con capacidad para 500 mL, una varilla agitadora de teflón, una pieza bifurcada con los brazos formando un ángulo de 105° a los que se une un termómetro de varilla y la conexión para el suministro de nitrógeno al sistema, y un sistema de reflujo. Para agitar la mezcla de reacción se ha empleado un agitador mecánico (Figura 5).

Se añadieron 7,28 g (20 mmol) de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 22,48 g (100 mmol) de 1,2-hexadecanodiol, 18,83 g (60 mmol) de ácido oleico, 22,92 g (60 mmol) de oleilamina y 200 mL de 1-octadeceno a un matraz de reacción de 500 mL y calentó bajo corriente de N_2 hasta llegar a los 200°C donde se mantuvo la temperatura durante 2 horas. La velocidad de calentamiento escogida fue de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Tras la etapa de estabilización a 200°C se aumentó la temperatura de la reacción hasta el punto de ebullición del disolvente (310°C). La subida hasta la temperatura de ebullición del disolvente se realizó a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Se mantuvo la reacción a reflujo durante diferentes intervalos de tiempo en función del tamaño de partícula que se espera obtener: a) 30 minutos, 7 nm (D7); b) 60 minutos, 10

nm (D10); c) 90 minutos, 12 nm (D12). Por último se enfrió lentamente la reacción hasta llegar a temperatura ambiente.

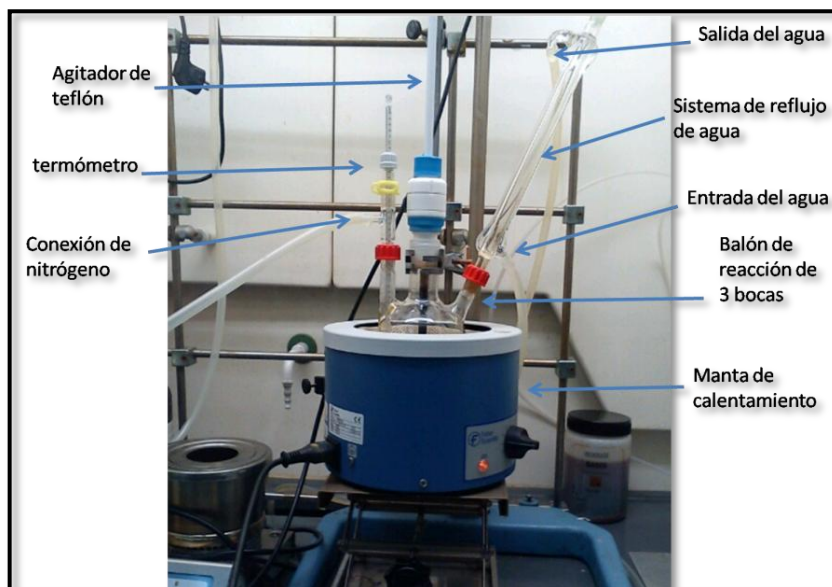


Figura 5. Montaje experimental del proceso de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por descomposición en medio orgánico.

La mezcla de reacción que contiene las nanopartículas se centrifugó con etanol durante 15 minutos a 9000 rpm quedando las partículas coaguladas. El sobrenadante, que posee color amarillo y está compuesto por el disolvente y los surfactantes no unidos, se eliminó por decantación magnética. El ciclo se aplicó varias veces hasta que el sobrenadante presentó un color transparente.

Para obtener las partículas como ferrofluido sin presencia de impurezas, se añadió hexano y se volvió a centrifugar dos veces con el fin de coagular posibles agregados de partículas y la pequeña cantidad de etanol que pudiese quedar presente. Para recuperar el ferrofluido puro se tomó toda la suspensión desechando el precipitado que contenían los agregados y restos de etanol.

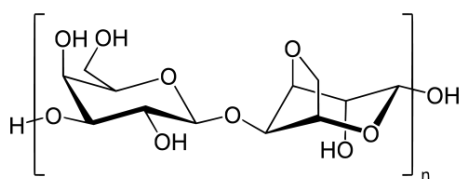
2.3. Modificación superficial

2.3.1. Recubrimiento con Agarosa

La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular, bioquímica y biología celular. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis, además de ser utilizada para fijar moléculas a su estructura como anticuerpos, antígenos y enzimas (Dias et al., 2011).

Sin embargo, existen escasos informes en la literatura de nanopartículas de hierro modificadas superficialmente con agarosa (Safdarian et al., 2013; Tripathi et al., 2013). Estos trabajos están dirigidos a aplicaciones medioambientales de purificación de aguas mediante el empleo de nanopartículas magnéticas capaces de arrastrar metales pesados o tóxicos. Sin embargo, la agarosa es un polímero muy utilizado en numerosas aplicaciones biológicas (DeRosa et al., 2011). Su gran versatilidad se debe a su carácter hidrofílico, biocompatibilidad y biodegradabilidad y la posibilidad de formar matrices flexibles y porosas.

La agarosa es un polisacárido formado por unidades repetitivas de agarobiosas ((1-3)- β -D-galactopiranososa y (1-4)-3,6-anhydro- α -L-galactopiranososa) que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*.



Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales. Estas sustituciones se pueden modificar para que la temperatura de gelificación varíe entre los 17 y los 40 °C.

En su forma más básica, las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro que se utilizan en aplicaciones biomédicas, están constituidas por un núcleo inorgánico de hierro y su superficie modificada de forma tal que su interacción con el medio biológico sea lo más biocompatible posible, mientras se mantiene su estabilidad coloidal (Berry, 2009). Uno de los retos más importantes en nanomedicina hoy en día, consiste en la modificación

superficial de las nanopartículas que permita su redispersión en medio acuoso manteniendo radios hidrodinámicos <100 nm. Es necesario entonces, el desarrollo de técnicas que permitan controlar la dispersión de las nanopartículas en medio acuoso vs el fenómeno de agregación al que tienden naturalmente las nanopartículas y que es especialmente relevante en el caso de las partículas magnéticas. Existen numerosos métodos para estabilizar las partículas de magnetita en agua. Estos métodos se pueden clasificar en función de la naturaleza del recubrimiento (orgánica e inorgánica). Los recubrimientos orgánicos se pueden realizar a partir de diferentes reacciones químicas como pueden ser: intercambio de ligandos entre moléculas bifuncionales (Huh et al., 2005; Taboada et al., 2007), modificación del doble enlace del ácido oleico que recubre las nanopartículas obtenidas por métodos de descomposición térmica fundamentalmente (Herranz et al., 2008), y recubrimiento/encapsulación con polímeros (Amstad et al., 2009; Xie et al., 2007) y/o liposomas (Dubertret et al., 2002). Por otra parte, los recubrimientos de naturaleza inorgánica estudian la estabilización de la suspensión coloidal a partir de la repulsión electrostática que ofrecen estas moléculas inorgánicas con que se modifica superficialmente la nanopartícula. Entre los métodos más estudiados se encuentra el recubrimiento con sílice donde lo más común es emplear el TEOS como precursor (Aslam et al., 2005); o el recubrimiento con oro (Tamer et al., 2013).

Sin embargo, es dentro del área de las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, donde resulta más interesante estudiar la modificación superficial de las nanopartículas con ligandos bio-específicos por sus potenciales aplicaciones. Una vez obtenida la suspensión coloidal estable en medio acuoso, y en dependencia de los grupos funcionales disponibles en la superficie, es posible la conjugación con biomoléculas que permitan una orientación de las nanopartículas hacia una determinada zona, el enlace de marcadores que permitan estudiar la localización de dichas nanopartículas o la unión de fármacos para el diseño de sistemas de liberación controlada.

En este trabajo se han seleccionado tres tipos de recubrimientos, uno de bajo peso molecular como el DMSA, con propiedades apantalladoras pobres pero muchos grupos activos para ser funcionalizados, un polímero como el PEG muy biocompatible y un polímero natural como la agarosa.

2.3.2. Intercambio de ligandos con DMSA

La reacción de intercambio de ligandos empleando ácido dimercaptosuccínico (DMSA) ha sido utilizada en la modificación superficial de nanopartículas magnéticas que

interesan mantener como suspensiones estables en medio acuoso (Huh et al., 2005; Jun et al., 2005; Roca et al., 2009). Esta reacción es de equilibrio, es decir, se ve favorecida por el aumento de la temperatura y el exceso de ligandos que van a unirse a las nanopartículas. En el caso de nanopartículas obtenidas por descomposición en medio orgánico, estas se encuentran recubiertas de ácido oleico en la superficie. El DMSA al tener dos grupos funcionales, será capaz de desplazar el surfactante de la superficie de la nanopartícula debido a la alta capacidad coordinativa de este grupo ácido, mientras que el otro grupo carboxilo es capaz de estabilizar las nanopartículas en la suspensión acuosa por repulsión electrostática (Roca et al., 2009) (Figura 6).

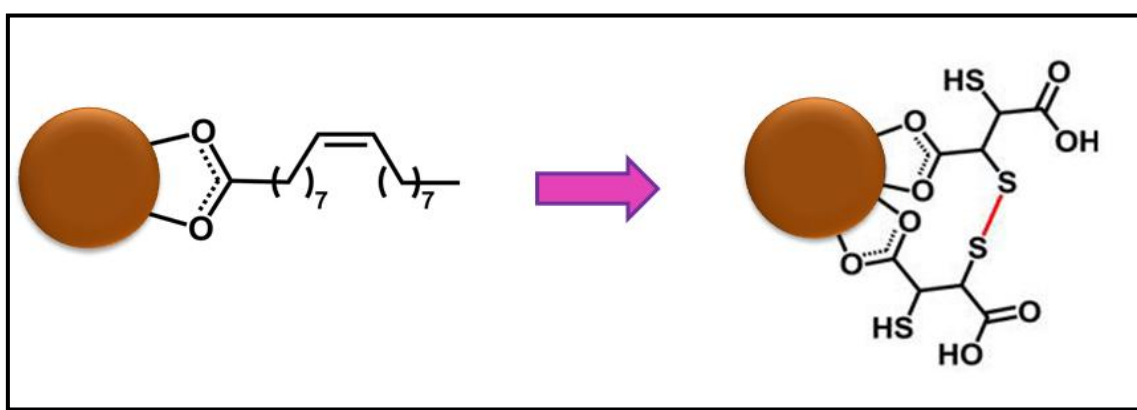
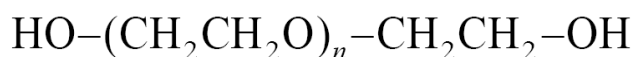


Figura 6. Representación esquemática de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico (izquierda) y modificadas con DMSA después de la reacción de intercambio de ligandos (derecha).

2.3.3. Modificación con PEG

La aplicación biomédica de las nanopartículas también requiere de la optimización de parámetros como el tiempo de residencia en sangre de las mismas, así como su biocompatibilidad. De ahí que una de las estrategias más utilizadas de modificación superficial de las nanopartículas sea el recubrimiento con distintos polímeros, ya sea durante la síntesis o como modificación post-síntesis (Iijima and Kamiya, 2009). Tal es el caso de la modificación con polímeros como el dextrano o el polietilenglicol (PEG) (Allard-Vannier et al., 2012; Kohler et al., 2004; Laurent et al., 2008; Re et al., 2012). La conjugación a PEG también reduce la captación de las mismas por macrófagos, además de retardar el proceso de degradación de las nanopartículas (Perrault et al., 2009).

En su forma más común, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter polimérico con grupos hidroxilos en sus extremos y estructura general:



La habilidad del PEG de ser soluble tanto en agua como en solventes orgánicos permite que pueda ser funcionalizado fácilmente y que la conjugación química a nanopartículas o biomoléculas pueda hacerse en condiciones suaves que no afecten la estabilidad de estas. Estudios del PEG en solución acuosa han demostrado que este polímero une 2-3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno. Debido a su alta flexibilidad y a la unión de las moléculas de agua el PEG actúa como si fuera 5-10 veces más grande que una proteína soluble de masa molecular comparable. Se ha sugerido que estas propiedades son las responsables de que el PEG: (1) disminuya la captación celular, (2) excluya a las proteínas y células de las superficies, (3) reduzca su inmunogenicidad y antigenicidad y (4) prevenga la degradación de las proteínas por enzimas y células de mamíferos (Wattendorf and Merkle, 2008).

Los oligómeros de PEG de bajo peso molecular (<400 Da) son degradados a metabolitos tóxicos por la alcohol deshidrogenasa. Sin embargo, la no toxicidad de los PEG de más de 1000 Da ha sido demostrada por varios años de uso en alimentos, cosméticos y medicamentos. Estos últimos incluyen formulaciones inyectables, tópicas, rectales, intranasales y oculares (Webster et al., 2009).

El PEG es eliminado *in vivo* rápidamente sin cambios estructurales. La vía de eliminación depende de la masa molecular, si es menor de 20 kDa se elimina en la orina y si es mayor, en la orina y en las heces (Webster et al., 2007). El PEG es un inmunógeno débil, incluso los de altos pesos moleculares. Anticuerpos contra PEG sólo se han generado mediante la conjugación a una proteína muy inmunogénica y utilizando Adyuvante de Freund. Además, no se ha observado generación de anticuerpos anti-PEG durante la aplicación clínica “normal” de proteínas PEGiladas, así como de ningún patrón de toxicidad o efectos adversos asociados a la presencia del PEG en las formulaciones farmacéuticas aprobadas (Webster et al., 2009).

Los enfoques actuales para unir el PEG a las nanopartículas magnéticas pueden resumirse de tres formas fundamentalmente: aquellos que implican la unión no covalente del polímero a la superficie de la nanopartícula, mediante unión covalente, o los procesos que conducen a la formación de grandes agregados poliméricos con una proporción limitada de núcleos magnéticos en su interior, y por tanto una señal magnética pobre. La inmovilización no covalente del PEG en la superficie de la nanopartícula está basada en la adsorción física del polímero a las nanopartículas, así como interacciones de naturaleza

hidrofóbicas o electrostáticas (Chen et al., 2010; Yallapu et al., 2010; Zhang et al., 2008). Un ejemplo de este tipo de metodología puede ser la unión de moléculas de PEG diácido, mediante activación por radiación ultravioleta (Amici et al., 2011). Sin embargo las partículas que se obtienen con esta metodología presentan una estabilidad temporal limitada así como en un rango de pH muy pequeño.

La unión covalente del PEG a las nanopartículas se puede lograr a través de un proceso de quimisorción del polímero sobre la superficie de la partícula o mediante el uso de pequeñas moléculas heterobifuncionales. Un ejemplo de protocolos de funcionalización mediante quimisorción consiste en la modificación superficial de las nanopartículas durante el proceso de coprecipitación, el recubrimiento tiene lugar *in situ* (Kumagai et al., 2007). En este trabajo las nanopartículas que se obtienen presentan un radio hidrodinámico entre 40 y 270 nm, lo cual indica una elevada polidispersidad en la muestra. En el caso del empleo de moléculas heterobifuncionales la estrategia de PEGilación es muy similar a la empleada tradicionalmente con proteínas donde es característica la formación de enlaces amidas o ésteres mediados por carbodiimida (Nakajima and Ikada, 1995). Este es el caso de nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido cítrico, donde se añade carbodiimida para formar un enlace amida con las cadenas de un PEG aminado (Lattuada and Hatton, 2007). Otra estrategia es la funcionalización de las nanopartículas obtenidas por coprecipitación con grupos amino-silanos que luego son unidos covalentemente, en una reacción mediada por carbodiimida a diferentes PEG funcionalizados (Sun et al., 2010; Yoo et al., 2012).

Por otra parte, se han desarrollado métodos de recubrimiento con PEG de partículas obtenidas por descomposición térmica en medio orgánico.. Ejemplo de ello es la formación de una cubierta estable (80% del peso total) mediante el empleo de moléculas bifuncionales PEG-lípidos, los cuales se intercalan con las moléculas de ácido oleico (Yue-Jian et al., 2010). A pesar de las excelentes propiedades coloidales de estas nanopartículas (<60 nm de radio hidrodinámico) la presencia de ácido oleico podría acarrear indeseables efectos adversos. La presencia de moléculas de ácido oleico que se puedan liberar durante el proceso de degradación de la nanopartícula podrían provocar disfunción celular, metabolismo lipídico alterado, formación de ceramidas, alteración de la síntesis de óxido nítrico, y el aumento de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aronis et al., 2008). También se ha estudiado el recubrimiento con PEG de nanopartículas obtenidas por esta metodología a través de reacciones de intercambio de ligando con reactivos de PEG silanos funcionalizados como trifluoroetilester (Kohler et al., 2004), PEG-dopamina (Amstad et al., 2009; Xie et al., 2007) o funcionalizando la superficie de las nanopartículas con un anhídrido trietoxisililpropilsuccínico y posterior conjugación mediante

carbodiimida a un PEG aminado (Fang et al., 2009). En el primer caso se requiere la síntesis previa del reactivo de PEG lo cual complica un poco el proceso general de síntesis. En el segundo caso, a pesar de que se obtienen nanopartículas con excelentes propiedades coloidales, la presencia de dopamina en el sistema constituye una desventaja para aplicaciones *in vivo*. La liberación de dopamina al medio podría provocar alteraciones inmunológicas dado su papel en la regulación de respuesta inmune, provocando una mayor susceptibilidad a las infecciones por los patógenos intracelulares y la inhibición subsiguiente de la respuesta Th1 y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Carr et al., 2003). En el último caso los autores son capaces de obtener nanopartículas recubiertas con radios hidrodinámicos de 50 nm, lo cual constituye una gran ventaja para futuras aplicaciones biomédicas y deja las puertas abiertas para un mayor estudio sobre la modificación covalente con PEG de nanopartículas magnéticas obtenidas por descomposición en medio orgánico.

2.3.4. Sección Experimental

2.3.4.1. Recubrimiento con Agarosa

Las partículas de magnetita preparadas por coprecipitación se recubrieron con agarosa mediante dos procedimientos, *in situ* durante la síntesis de las partículas y en un paso posterior a la síntesis.

Procedimiento en un solo paso: Este método permite la preparación de nanopartículas de óxido de hierro y su recubrimiento con agarosa al mismo tiempo. Para este propósito, 100 mL de una solución de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,1 g) se mezclaron con 10 mL de una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (8,08 g). Esta mezcla se añadió a 400 mL de una disolución alcalina (NH_4OH , 1M) con 4,2 g de agarosa. Las nanopartículas se centrifugaron (2000 rpm, 5 min) cuatro veces y se colectó el sobrenadante. Finalmente las partículas se centrifugaron (5000 rpm, 5 min) y se recogió la fracción que se mantuvo estable en el sobrenadante (MAgr). Las nanopartículas se dializaron frente a agua destilada durante 48 horas.

Procedimiento en dos pasos: En una primera etapa se sintetizaron las nanopartículas magnéticas vía coprecipitación como se describe anteriormente y se pasó a la modificación superficial con el polímero. La agarosa (5 mg) se disolvió en NaOH (0,5 M) y se añadió a las nanopartículas muy lentamente. La mezcla se mantuvo en un baño de

ultrasonidos (6 h, 25 ° C), seguido por diálisis extensiva durante 48 horas (M6-Agr, M8-Agr y M12-Agr). De forma similar se obtuvieron partículas recubiertas con DMSA y dextrano aminado para comparar con partículas con diferente carga superficial (Luengo et al., 2013).

2.3.4.2. Intercambio de ligandos con DMSA

La preparación de las partículas de magnetita recubiertas de DMSA se realizó en dos etapas; la primera de ellas fue la síntesis de las partículas por descomposición térmica en medio orgánico descrita en [2.3.1] y la segunda el intercambio de ligandos con DMSA. Para la obtención de las partículas estabilizadas en agua (NP-DMSA), se floclaron con etanol 50 mg de partículas y resuspendieron en 40 mL de tolueno donde posteriormente se añadió una disolución de 90 mg de DMSA en 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). La mezcla resultante se sonicó durante 5 minutos y agitó mecánicamente en una noria durante 48 horas. Una vez terminada la agitación se lavaron y centrifugaron sucesivamente las partículas con etanol. A continuación se redispersaron las partículas en agua y se añadieron unas gotas de NaOH para reducir el diámetro hidrodinámico de la suspensión. Finalmente se dializó la suspensión durante 3 días y filtró a presión por un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro.

2.3.4.3. Reacción de conjugación a PEG

Para el estudio de la reacción de conjugación a polietilenglicol se emplearon polímeros basados en polietilenglicol de diferente longitud y cantidad de grupos activos: O-(2-aminoetil) polietilenglicol, (750 y 5000 Da) (PEG-NH₂), O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, (2000, 6000 ó 20000 Da) (PEG-(NH₂)₂), y poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol)-poli (propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), 1900 Da (PEG-Prop-(NH₂)₂). Se empleó como método de conjugación una reacción mediada por carbodiimida (EDC) que permitió la activación de los grupos carboxilos del DMSA y su posterior conjugación a los grupos amino del PEG. La reacción se llevó a cabo en un baño de ultrasonido refrigerado empleando 100 mg de NP que fueron mezcladas con 40 mg de los derivados de PEG. La cantidad total de EDC empleado en la reacción (10 mg) fue dividida en 5 alícuotas que fueron añadidas cada dos horas y la última adición se realizó 12 horas

después. La relación molar entre grupos COOH/ grupos NH₂/ EDC fue 1:1,5:1. El pH fue ajustado a 6 y la mezcla fue sonicada (30 h, 25°C), y finalmente dializada extensivamente.

2.4. Funcionalización con diferentes moléculas bioactivas

Las propiedades superficiales de las nanopartículas magnéticas permiten que estas puedan ser funcionalizadas con una gran variedad de moléculas. Las principales ventajas que se aprovechan son la presencia de grupos funcionales que condicionan el tipo de interacción entre las NPM y la molécula de interés, el incremento del área superficial disponible en un sistema nanoparticulado y la capacidad de manipulación mediante un campo magnético. Existen numerosos trabajos en la literatura de funcionalización de nanopartículas magnéticas con enzimas, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos que muestran el desarrollo creciente de la nanobiotecnología (Berry, 2009). En este trabajo se ha estudiado la funcionalización de diferentes nanopartículas magnéticas con una proteína de fusión que contiene un dominio peptídico lectina β -trébol como etiqueta de afinidad y solubilidad y con dos péptidos bioactivos (CIGB-300 y CIGB-500).

2.4.1. Proteína de fusión que contiene un dominio peptídico lectina β -trébol

LSL es una proteína que presenta actividad hemaglutinina y hemolítica, producida por el hongo *Laetiporus sulphureus*. La estructura cristalina de la proteína ha sido resuelta con una resolución de 2.6 Å (Mancheño et al., 2005). En dicha estructura se observa que LSL es una proteína hexamérica y cada monómero de 35 kDa está compuesto por un dominio N-terminal tipo lectina y un dominio C-terminal con actividad formadora de poros. El dominio N-terminal tipo lectina tiene una estructura β -trébol similar a las estructuras descritas para diferentes toxinas (dominio HA1 de la toxina botulínica de *Clostridium botulinum*, Ricina y Abrina) donde se ha descrito una capacidad de unión a residuos de carbohidratos. En especial, la estructura de LSL ha sido resuelta en complejo con dos residuos de lactosa lo que muestra dos sitios de unión por monómero para este carbohidrato.

El dominio N-terminal tipo lectina β -trébol (LSL₁₅₀) ha sido obtenido de forma recombinante como proteína de fusión con varias proteínas de interés biotecnológico. La

presencia de un sitio de corte para una endoproteasa (TEV) entre ambas proteínas representa una gran ventaja para numerosas aplicaciones de interés biotecnológico (Angulo et al., 2011).

2.4.2. CIGB-300

El CIGB-300 es una molécula de naturaleza peptídica que inhibe el evento de fosforilación catalizado por la enzima Caseína Quinasa 2 (CK2) a través de la interacción directa con el sitio fosfoaceptor en el sustrato (Perea et al., 2004). La enzima CK2 participa en la fosforilación de más de 300 proteínas celulares que en su conjunto representan cerca del 20% del fosfoproteoma celular (Salvi et al., 2009). Entre los sustratos de esta enzima se encuentran factores transcripcionales, moléculas que participan en vías de señalización, modificadores del ADN/ARN, reguladores de la síntesis proteica, proteínas estructurales, y enzimas del metabolismo celular. La enorme diversidad funcional de los sustratos fosforilados por la CK2 sustenta el carácter pleiotrópico de la enzima a través de su participación en procesos celulares globales como la síntesis de ARN ribosomal y de transferencia (Ghavidel and Schultz, 2001), la apoptosis (Guo et al., 2001), la supervivencia celular (Ahmed et al., 2002), y la transformación maligna (Tawfic et al., 2001).

Estudios previos han demostrado la capacidad de este péptido para inhibir la proliferación celular y retardar el crecimiento tumoral en un modelo singénico de cáncer (Perea et al., 2008).

2.4.3. CIGB-500

El GHRP6 (CIGB-500) es un péptido sintético de seis aminoácidos que es miembro de la familia de agentes secretagogos de la Hormona de Crecimiento (GH) (Bowers, 1998). Además de promover la secreción de la GH, las evidencias indican que el GHRP6 y sus análogos sintéticos (GHRP1, GHRP2, hexarelina) pueden ejercer acciones cardiovasculares; como es el incremento de la contractilidad del miocardio (Bisi et al., 1999), y la prevención de la disfunción sistólica y diastólica inducida por la isquemia o por una MCD familiar (Tivesten et al., 2000). Los mecanismos moleculares que subyacen tras estos efectos cardioprotectores de los GHRP no están identificados completamente. Este péptido también se une con gran afinidad al receptor CD36 que se encuentra distribuido de

forma ubicua en el organismo (Febbraio et al., 2001). Teniendo en cuenta la disponibilidad de este receptor en el hígado, se ha observado que la administración del péptido CIGB-500 en modelos animales de fibrosis hepática ha reducido significativamente la progresión de la enfermedad ya que podría actuar como un agente hepatoprotector (Berlanga-Acosta et al., 2012).

2.5. Caracterización

2.5.1. Materiales

Todos los reactivos y solventes utilizados presentaban un grado de pureza analítico (>98%) y fueron suministrados por distintas casa comerciales (MERCK, Sigma, Fluka). El péptido CIGB-300 fue obtenido con una pureza superior al 98% en la unidad de Síntesis Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana). El péptido CIGB-500 fue obtenido con una pureza superior al 98% en los laboratorios Lipotec SA (Barcelona, España). Los anticuerpos Ab55735, Ab75973 y Ab85370 fueron adquiridos en Abcam (España). Las ratas, de la línea Wistar, hembras, de 9 a 10 semanas de edad y de 200 a 250 g de peso corporal; se adquirieron en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Cuba) y en la Universidad de Brasilia. Estos animales se mantuvieron y manipularon en concordancia con lo aprobado por los comités de ética para el uso y cuidado de animales de laboratorio de las correspondientes instituciones. No existieron especificaciones de agua, comida o condiciones de alojamiento para los animales, en ninguno de los ensayos realizados.

2.5.2. Técnicas

2.5.2.1. Nanopartículas

La microscopía de transmisión electrónica (TEM: 200-keV JEOL-2000 FXII) se utilizó para medir el tamaño, forma y distribución de las partículas tanto en medio orgánico como después de transferidas a medio acuoso. Se depositó una gota diluida de las diferentes

suspensiones de nanopartículas sobre una rejilla de cobre y se dejó secar en una estufa a 50°C antes de ser observadas al microscopio electrónico.

Con la espectroscopía infrarroja (FTIR: Nicolet 20 SXC) se caracterizó el recubrimiento de las nanopartículas a través de la identificación de los grupos funcionales. Las muestras se prepararon al 2% en peso de nanopartículas en KBr y compactaron hasta formar la pastilla que se emplea para el análisis.

El análisis termogravimétrico (Seiko TG/ATD 320 U, SSC 5200) a 10°C/min y en flujo de aire de aproximadamente 10 mg de muestras, previamente secadas a 50°C en la estufa permitió cuantificar dicho recubrimiento orgánico en los diferentes procesos de síntesis y posterior modificación superficial.

El magnetómetro de muestra vibrante (VSM, MLVSM9 MagLab 9 T, Oxford Instruments) ha permitido evaluar las propiedades magnéticas de las nanopartículas en polvo y en líquido, así como su cuantificación en las diferentes muestras de tejidos. Se registraron las curvas de imanación a temperatura ambiente después de aplicar un campo máximo de entre 1 y 5 T, en función de la muestra y el tipo de estudio. Este tipo de medidas permite conocer el valor de la magnetización de saturación (M_s), que es el valor de la magnetización cuando todos los momentos magnéticos se encuentran alineados con el campo magnético externo aplicado. M_s es una propiedad intrínseca del material, por lo que conociendo la M_s de una mezcla podemos saber el porcentaje de material magnético presente en la misma.

Las medidas de susceptibilidad AC de los órganos se realizaron en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC (Universidad de Zaragoza). Se midió la susceptibilidad AC entre 5 y 300 K de temperatura. La amplitud del campo alterno ha sido en todos los casos de 0,41 Oe y la frecuencia de 11 Hz. Este tipo de medidas permite diferenciar los distintos tipos de material magnético presente en una muestra, de forma que podemos distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los tejidos extraídos de los distintos grupos de tratamiento y la que se debe a otros componentes magnéticos que pueda contener el tejido (ferritina).

El DLS (Nanosizer ZS, Malvern) permitió la caracterización de las propiedades coloidales de las nanopartículas. La medición de los diámetros hidrodinámicos (D_h) de las suspensiones se realizó a pH 7 en medio acuoso determinando el promedio de las medidas de intensidad. El grado de polidispersidad de la muestra (PDI, por sus siglas en inglés), se determinó dividiendo la desviación estándar de los valores entre el valor medio. La medición del potencial-Z de las partículas se realizó utilizando una solución de 0,001 M de

KNO₃, mientras que la variación de pH del medio se realizó empleando soluciones a 0,001 M de KOH o HCl.

Mediante el ICP-OES se ha podido conocer la concentración de Fe de las suspensiones, así como en las muestras de sangre y tejidos analizadas. Las muestras se digirieron con agua regia y se calentaron a 80°C durante 1 hora.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que emplea un anticuerpo para la detección específica del PEG se utilizó para la caracterización del recubrimiento de las nanopartículas modificadas con los diferentes polímeros. Se tapizó la placa de ELISA con el anticuerpo PEG02 (5 µg/ml en PBS (80 µl/pocillo)) a 4°C durante la noche. Posteriormente se lavó la placa con PBS y se bloqueó PBS 1X/BSA 0.5% (180 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se preparó un lote inicial de nanopartículas a 0,5 mg/mL en PBS/BSA 0,5% y se realizaron diluciones seriadas, añadiendo 80 µL por pocillo. Se incubó durante 1 hora y se lavó 5 veces con PBS 1x. Finalizado este paso, se lava de nuevo la placa 3 veces con PBS, y se incuba con el anticuerpo PEG02 biotinilado (2 µg/ml en PBS/BSA 0,5%) durante 1 hora. Se lava de nuevo la placa 3 veces con PBS, y se incuba con el conjugado a Strep-Avidina HRP (80 µl/pocillo), 1 hora a temperatura ambiente. Se empleó la relación 12 µl de conjugado+ 18000 µl de PBS/BSA 05%. Finalmente, se lava 5 veces la placa con PBS 1X, y se añade el sustrato (o-Fenilendiamina (OPD)) a temperatura ambiente. Relación 10 µl H₂O₂/20 ml OPD (80 µl/pocillo). Se para la reacción con H₂SO₄ 2.5 M (40 µl/pocillo). La lectura de los valores de absorbancia se realiza a 405 nm. La técnica de ELISA también fue utilizada para la cuantificación de diferentes proteínas de la ruta metabólica del hierro (DMT-1, Ferroportina, y Ferritina) a partir de homogenados de hígado, riñón y bazo de rata. Los anticuerpos monoclonales utilizados para la captura fueron Ab55735, Ab75973 y Ab85370. Para la detección se empleó un anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa y se empleó como sustrato el OPD.

Los valores de relaxividad (R_i , $1/T_i$, s⁻¹, $i = 1, 2$) de las suspensiones de nanopartículas, así como de las muestras de sangre se obtuvieron a través de la medición de los tiempos de relajación (T_i , s) a 37 °C, empleando un campo magnético de 1.5 T y una secuencia T2 CP (Minispec MQ60, Bruker). El ajuste lineal de los valores de R_i a diferentes concentraciones de Fe permitió calcular el valor de relaxividad de las muestras (r_i , s⁻¹ mM⁻¹) mediante la ecuación: $R_i = R_b + r_i[Fe]$

El HPLC se utilizó para la cuantificación de los diferentes péptidos en los estudios de caracterización de las reacciones de unión péptido:nanopartículas. Se empleó una columna Aeris PEPTIDE 3.6u XB-C18 de 250 x 4.6 mm.

La electroforesis SDS-PAGE se utilizó para el estudio de unión de las proteínas LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂ a NPM con diferentes tipos de recubrimiento. Se emplearon geles lineales (15% acrilamida). Estos fueron teñidos específicamente para proteínas con Coomassie brilliant blue R-250 (CBB). Las imágenes digitales de los geles fueron obtenidas con un escaner ScanJet 4c/T (Hewlett Packard) y analizadas con el software Image J v1.32.

2.5.2.2. Ensayos celulares

Los ensayos celulares se han llevado a cabo en cultivos de diferentes líneas celulares (HeLa, HepG2, MCF-7, MCF-10). Las células se cultivaron según las especificaciones recomendadas para cada línea (<http://www.atcc.org>). Los cultivos celulares se realizaron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Para los experimentos de internalización de las nanopartículas dentro de las células, estas crecieron sobre cubreobjetos y se incubaron durante distintos intervalos de tiempo (24-72 horas) a distintas concentraciones de nanopartículas (0,05 Fe/ml, 0,1 mg de Fe/ml, 0,3 mg de Fe/ml y 0,5 mg de Fe/ml). Una vez finalizada la incubación, se eliminó el medio de cultivo donde se encontraban las partículas y las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) para su observación inmediata en un microscopio óptico. De forma paralela, células que habían recibido el mismo tratamiento se procesaron para realizar la tinción con azul de Prusia, que tiñe de azul el hierro de forma específica. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP50.

La citotoxicidad de las células HeLa al ser incubadas con las nanopartículas se determinó mediante ensayos MTT (Sigma, St Louis, USA). Una vez pasadas 24 horas de la incubación de las células con las partículas se añadió MTT a cada pocillo (100 µg/mL en el medio) y dejó reaccionar durante 3 horas a 37 °C. Tras ese tiempo, el formazán creado en las células fue diluido añadiendo 0,5 mL de DMSO en cada placa y la densidad óptica fue medida a 540 nm en un espectrofotómetro (Tecan Spectra Fluor). La supervivencia celular fue expresada como el porcentaje de absorbancia de las células tratadas en comparación con la de las células control (que no estaban incubadas con nanopartículas). Los resultados obtenidos son el valor medio y la desviación estándar de al menos 6 experimentos.

La proliferación y migración celular se evaluó en tiempo real mediante un analizador xCELLigence RTCA-DP (Roche & ACEA). El sistema permite la medición de la

impedancia en el fondo del pocillo de cultivo que se encuentra conectado a unos microelectrodos a través de los cuales se aplica una corriente de 20 mV. Al aumentar el número de células en el fondo del pocillo se produce un aumento de la impedancia.

La genotoxicidad de las nanopartículas se determinó mediante el ensayo de Cometa. Se mezclaron 120 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (7%) con 40 μ L de sangre periférica extraída de las ratas y aplicadas sobre portaobjetos previamente recubiertos con agarosa. Estas láminas fueron sometidas a una electroforesis (25 Volts, 300 mA) y fijadas en metanol. Se contaron 150 células por individuo (test ciego) empleando una tinción con bromuro de etidio en un microscopio de fluorescencia (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100).

2.5.2.3. Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* de Resonancia Magnética Nuclear (1,5 T Symphony Maestro class MRI Siemens scanner (Germany)) se realizaron empleando ratas Wistar como modelo animal. Los parámetros empleados fueron los siguientes: Secuencia de pulsos: T2 Turbo Spin Eco (TSE) con Tiempo de Eco Time (TE) de 64 ms and Tiempo de Repetición (TR) de 4000 ms. La secuencia VIBE fue examinada también con TE = 4 ms y TR = 11,3 ms. Las imágenes registradas se analizaron empleando la versión del programa eFilm 2.1.1. Se midió la intensidad de dos áreas del hígado (0,4 cm²) y se utilizó como control un área (0,1 cm²) correspondiente al músculo. Con las intensidades medidas de cada imagen I_i se determinó la relación $(I_i - I_0)/I_0$ en función del tiempo para seguir *in vivo* el proceso de absorción, residencia y excreción de las nanopartículas en el hígado.

Los estudios de biodistribución y degradación o eliminación de las nanopartículas fueron realizados en ratas Wistar empleando dos dosis diferentes (0,5 y 2,5 mg/kg de peso del animal) inyectadas por vía intravenosa y se hizo un seguimiento hasta 60 días después de la administración de las nanopartículas. Se sacrificaron los animales y se colectaron diferentes órganos: hígado, bazo, pulmones y riñones. Algunos fragmentos fueron homogeneizados y extraídas las proteínas del tejido, otros embutidos en parafina y preparados para su observación al microscopio óptico, y otros liofilizados y analizados por técnicas magnéticas y no magnéticas.

Capítulo 3. Inmovilización de enzimas sobre nanopartículas magnéticas

*3.1 Síntesis de nanopartículas
recubiertas de agarosa*

*3.2 Estudio de inmovilización de
lectinas*

*3.3 Carácter bioespecífico del sistema
LSL₁₅₀-NPM*

Capítulo 3. Inmovilización de enzimas sobre nanopartículas magnéticas

La heterogeneidad química y estructural de las proteínas impide desarrollar protocolos universales de alto rendimiento universales para la purificación y caracterización de estas moléculas (Waugh, 2005). Otros problemas relevantes asociados al diseño de este tipo de procesos son el bajo rendimiento en la producción y la escasa solubilidad de muchas de las proteínas sobre-expresadas (Esposito and Chatterjee, 2006). Una aproximación bastante empleada en el desarrollo de protocolos de alto rendimiento de producción/purificación de proteínas en *E. coli* es el uso de etiquetas de afinidad ("affinity tag")(Waugh, 2005). Estas etiquetas son proteínas o péptidos que, fusionados a la proteína recombinante de interés, idealmente permitirían aumentar el rendimiento de su expresión, incrementar su solubilidad y/o desarrollar un protocolo simple y eficaz de purificación. Generalmente estas etiquetas se suelen ubicar hacia el extremo N-terminal de la proteína de interés, en donde proporcionaría un entorno eficaz para iniciar el proceso de traducción. Esto evita que el ARNm adopte estructuras secundarias que pudiesen interferir en la unión a los ribosomas (Hartz et al., 1991). Además deben permitir desarrollar un protocolo de purificación eficaz, potencialmente escalable con costes mínimos. En este sentido, la matriz de afinidad cobra especial relevancia durante el proceso de purificación. Por otro lado, la disociación de la proteína inmovilizada en la matriz debe producirse en condiciones no "agresivas" para el estado nativo de la proteína y cualquier estrategia basada en el uso de etiquetas de afinidad debe proporcionar la posibilidad de eliminarla de un modo eficaz. La disponibilidad de endoproteasas de gran especificidad como AcTEV® (Invitrogen) o PreScission® (Amersham Biotech) han mitigado notablemente este problema. Los aminoácidos determinantes de la especificidad de estas endoproteasas localizados en el lado C-terminal de la proteína y permanecerán en las etiquetas tras la hidrólisis. Sin embargo este enlace debe encontrarse accesible para la endoproteasa.

El módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus* (los primeros 150 aminoácidos: LSL₁₅₀) es funcional y se ha observado que se pliega adecuadamente acompañado de diferentes proteínas en su extremo C-terminal además de conservar su capacidad de unión de azúcares tipo agarosa (Angulo et al., 2011). Dicha

estructura se ha estudiado como etiqueta de afinidad para la purificación de proteínas de fusión empleando matrices cromatográficas derivadas de agarosa (Sephacrose™ 4B, 6B, CL-4B, CL-6B) y con el empleo de eluyentes como la D(+)-lactosa (Angulo et al., 2011).

En este trabajo se ha estudiado la interacción de dos lectinas (LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂) con nanopartículas recubiertas de agarosa con el objetivo de estudiar esta etiqueta de afinidad en procesos de purificación de proteínas de fusión utilizando las propiedades magnéticas de dichas partículas para facilitar su recuperación. Se determinará si el sistema tiene un carácter bioespecífico y orientado espacialmente dado por el reconocimiento a la agarosa y si es un proceso de interacción reversible mediado por lactosa.

3.1. Síntesis de nanopartículas recubiertas de agarosa

Para la obtención de partículas magnéticas recubiertas de agarosa se estudiaron dos métodos de síntesis. El primer método estudia la síntesis de las partículas en un solo paso, mientras que en el segundo procedimiento (en dos pasos) se obtienen las partículas de maghemita *via* coprecipitación y son funcionalizadas posteriormente con dicho polímero (Figura 7). Las nanopartículas magnéticas obtenidas según el procedimiento en un paso (MAgr), son obtenidas en presencia del polímero. A pesar de que este procedimiento presenta grandes ventajas en cuanto a rendimientos y rapidez, dichas partículas presentan una reducida actividad coloidal y una amplia distribución de agregados (Tamaño Hidrodinámico: 317 nm, PDI: 0,345) (Figura 8C). Las partículas presentan una carga superficial baja a pH 7 ($Z=-6$ mV), sin embargo su punto isoeléctrico es bastante cercano al de la maghemita sin modificar ($PI=6$) (Garcell et al., 1998)(Figura 8D). En este caso, el tamaño de partícula no se puede controlar y es un tamaño reducido ya que resulta de una nucleación y un crecimiento limitado por la presencia del polímero en el medio de reacción.

Por otra parte, las partículas obtenidas según el protocolo en dos pasos presentan radios hidrodinámicos menores y una distribución de tamaño más estrecha. Las propiedades físico-químicas de las partículas de maghemita de diferentes tamaños (M6, M8 y M12) obtenidas por coprecipitación han sido ampliamente descritas en una reciente publicación (delaPresa et al., 2012).

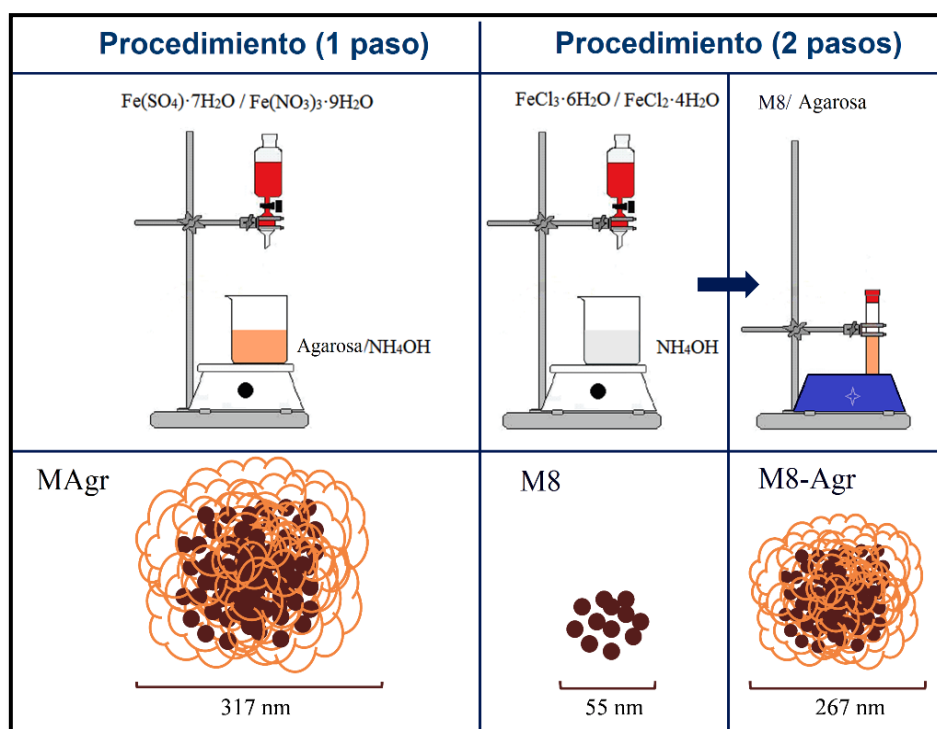


Figura 7. Representación esquemática de los procedimientos empleados para la obtención de nanopartículas recubiertas de agarosa.

También es posible observar diferencias en la carga superficial de las partículas a pH 7, por ejemplo, M6-Agr tiene una carga superficial a pH 7 de -15 mV mientras que M12-Agr presenta valores aproximados a -7 mV. Esto podría deberse a la relación inversa entre el tamaño de partícula y el área superficial disponible para la modificación con el polímero.

Tabla 3. Resumen de preparación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro.

| Muestras | Radio Hidrodinámico (nm) | PdI | Potencial Z (pH 7) |
|----------|--------------------------|-----|--------------------|
| M6 | 48 | 0,2 | 15 |
| M8 | 55 | 0,2 | 15 |
| M12 | 75 | 0,2 | 15 |
| M6-Agr | 256 | 0,2 | -15 |
| M8-Agr | 267 | 0,2 | -11 |
| M12-Agr | 282 | 0,2 | -7 |
| MAgr | 317 | 0,3 | -6 |

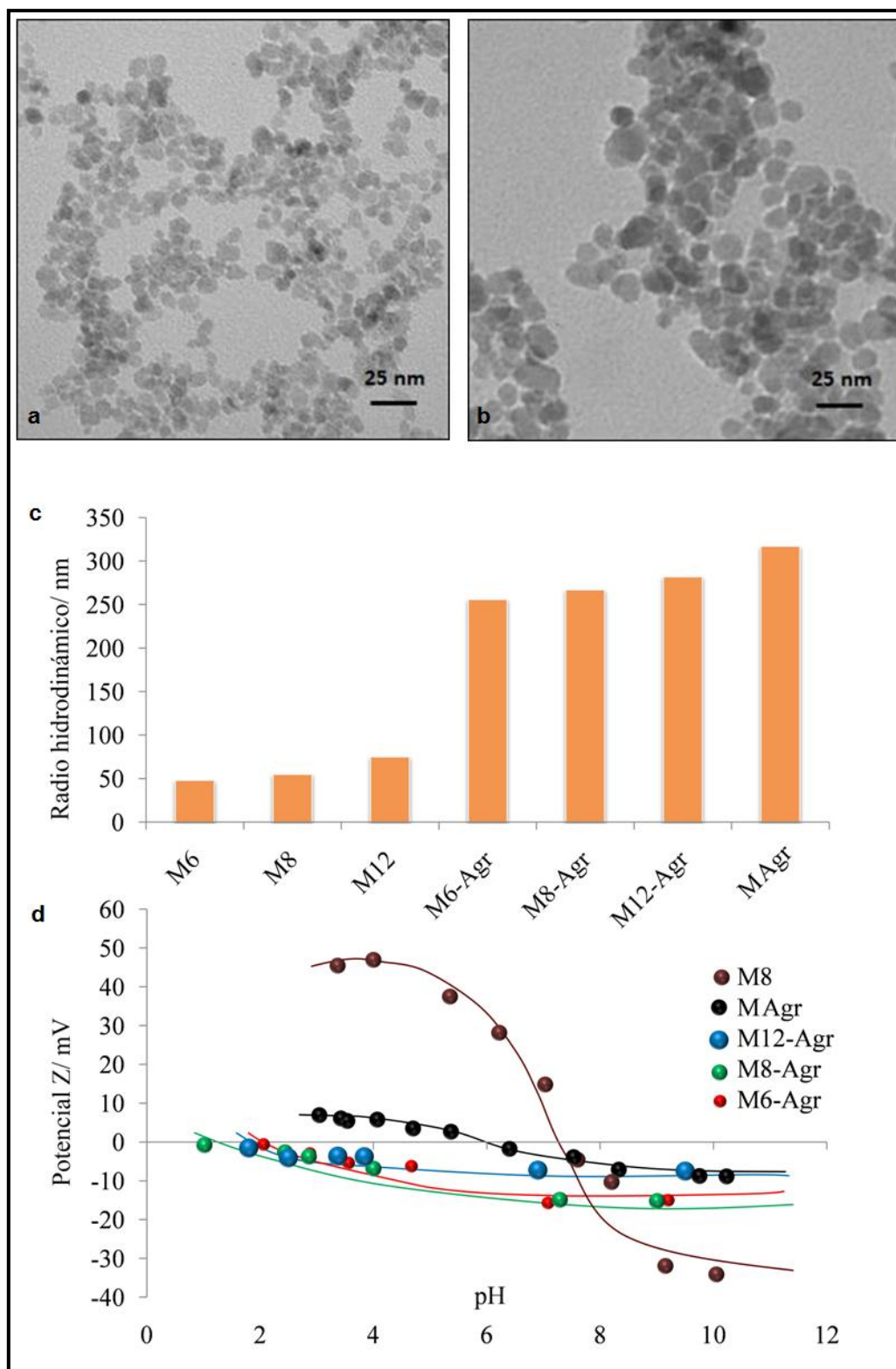


Figura 8. Imágenes de TEM de nanopartículas obtenidas por coprecipitación: A) 8 nm. B) 12 nm. Propiedades coloidales de las nanopartículas obtenidas en los diferentes procedimientos. (C) Radios hidrodinámicos. (D) Potencial Z en función del pH.

3.2. Estudio de inmovilización de lectinas

En colaboración con el Dr. José Miguel Mancheño (Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC) se realizó un estudio acerca de la interacción entre dos proteínas tipo lectina (LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂) y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con distintos recubrimientos orgánicos. Este proceso se estudió con las partículas recubiertas de agarosa obtenidas según los procedimientos descritos anteriormente. Además, con el objetivo de estudiar la influencia de la carga superficial de la partícula, así como el grado de especificidad en la unión proteína : partícula, también se analizó la interacción con NPM de maghemita sin recubrimiento (baja carga superficial a pH 7), modificadas con DMSA (cargadas negativamente a pH 7), y con aminodextrano (positivamente cargadas a pH 7) (Figura 9A).

3.2.1. Interacción con NPM con diferentes recubrimientos

Las proteínas fueron incubadas en viales de polipropileno de 1,5 mL con las nanopartículas (Relación: 10 mg NP : 1mg proteína) en un volumen final de mezcla de 50 μ L durante 2 horas. Las nanopartículas fueron separadas magnéticamente y el sobrenadante fue analizado mediante electroforesis SDS-PAGE. Los geles fueron teñidos con Comassie blue R-250 (CBB) como tinción específica para proteínas (Figura 9B yC) y analizados densitométricamente con el software Image J v1.32 (Figura 9D).

Como resultado general se observó que ambas proteínas muestran un comportamiento similar frente a los diferentes tipos de NPM. Sin embargo LSL₁₅₀ interactúa más fuertemente, lo cual pudiera estar debido a una mayor presencia de aminoácidos cargados en la superficie de la proteína en comparación con LBL₁₅₂. La mayor eficiencia de unión se obtuvo para las nanopartículas de maghemita sin recubrimiento M8 (proteína libre: LSL₁₅₀ (5%) y LBL₁₅₂ (15%)). Esto puede estar debido a que dichas partículas presentan numerosos grupos OH en su superficie, que podrían mimetizar los grupos que estas proteínas normalmente reconocen en su interacción con carbohidratos.

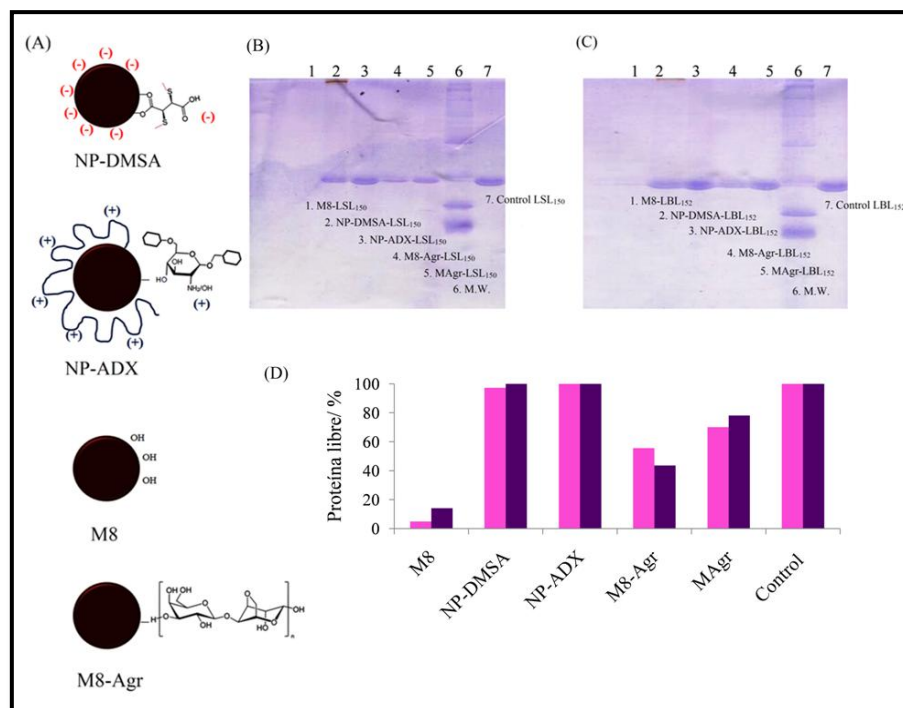


Figura 9. (A) Representación esquemática de las NPM con diferentes recubrimientos empleadas en el ensayo de unión a LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂. (B-C) Análisis por SDS-PAGE (gel: 15%) del sobrenadante colectado después de 2 horas de incubación de las nanopartículas en presencia de las proteínas a LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂. Los geles fueron teñidos con Coomassie blue (CBB). (D) Análisis densitométrico con el software Image J v1.32 para la cuantificación de proteína libre después del ensayo de unión a las NPM (■ LSL₁₅₀ y ■ LBL₁₅₂).

La estructura cristalográfica de esta proteína en ausencia de ligandos muestra que estos sitios de unión están ocupados por grupos OH de moléculas de agua mediante interacciones de Van der Waals y puente de hidrógeno. La interacción con estos grupos OH no requiere de ningún cambio conformacional de la proteína (Angulo et al., 2011). Además dichas partículas presentan el menor radio hidrodinámico y por tanto la mayor área superficial disponible para la interacción con dichas proteínas.

También se observó una fuerte unión a las nanopartículas recubiertas de agarosa. Sin embargo esta unión es más eficiente con las partículas obtenidas en dos pasos (proteína libre: (M8-Agr: LSL₁₅₀ (55%) y LBL₁₅₂ (45%); MAgr: LSL₁₅₀ (70%) y LBL₁₅₂ (80%)). Es posible que esto se deba a que dichas partículas presentan un mejor recubrimiento polimérico y una mayor área superficial disponible para la interacción con la proteína.

Por otra parte la interacción con las NPM recubiertas con DMSA (cargadas negativamente) y con aminodextrano (cargadas positivamente) resulta prácticamente nula. Esto podría sugerir que predomina una interacción bioespecífica de dichas proteínas con las partículas de maghemita o agarosa mediada por el reconocimiento de los aminoácidos que conforman los sitios de unión a este disacárido y no por interacciones electrostáticas de los aminoácidos superficiales.

3.2.2. Caracterización químico-física de los complejos LSL₁₅₀-NPM

Con el objetivo de estudiar las propiedades coloidales después de la unión de la proteína LSL₁₅₀ a las NPM de maghemita (M8) y recubiertas de agarosa (M8-Agr) se midieron el radio hidrodinámico y el potencial Z de las nanopartículas libres y en complejo con la proteína (Figura 10). Para ambos tipos de NPM el radio hidrodinámico aumenta después de la unión a la proteína. En el caso de las nanopartículas recubiertas de agarosa (M8-Agr) este pasa de 282 a 1563 nm (Figura 10A), mientras que las de maghemita sin recubrimiento (M8) aumentan de 42 a 82 nm (Figura 10B). Por otra parte, después de unir la proteína también se observa una reducción de la carga superficial neta a pH 7 (Figura 10C). La carga superficial de las NPM M8-Agr (-9,8 mV) y de M8 (11,2 mV) disminuye hasta valores de -5,6 mV y -3,18 mV respectivamente.

El análisis comparativo por espectroscopía infrarroja de las muestras de M8-Agr y en complejo con LSL₁₅₀ también confirmó la unión de la proteína a las nanopartículas. El espectro de la muestra M8-Agr consiste en un pico importante en la región de 550-600 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del enlace (Fe-O), así como un pico ancho entre 3000-3500 cm⁻¹ debido a los grupos OH presentes en la superficie de la NPM recubierta de agarosa (Roca et al., 2007). Después de la unión de la proteína aparecen bandas características de diferentes aminoácidos: 2000 cm⁻¹ (S-H de Cys), 1520 cm⁻¹ (OH de Tyr, and C-H, C-N de Trp), 1462 cm⁻¹ (CH₃ de Phe, C-N de Pro), 1375 cm⁻¹ (CH₃ de Val y Leu), 1150-1170 cm⁻¹ (γ-CH₂ de Trp y Thr), 1070 cm⁻¹ (grupo indol de Trp) y 967 cm⁻¹ (C-O de Ser) (Barth, 2007).

La eficiencia del proceso de recubrimiento fue evaluada a través de la cuantificación por termogravimetría del polímero unido a la nanopartícula de óxido de hierro. El análisis para las NPM de maghemita sin modificar muestra una pérdida de peso durante el calentamiento de ~8 %, debida a la eliminación de las moléculas de agua fisisorbida y quimiadsorbida a las nanopartículas (Figura 10G). M8-Agr mostró una pérdida total de peso del 16% de la cual el polímero representa un 8% (Figura 10E). Este resultado confirma la modificación superficial de las NPM con la agarosa ya observada por la variación de la carga superficial neta después del proceso de recubrimiento (Figura 8B).

Ambas NPM fueron analizadas en complejo con LSL₁₅₀. En el caso de M8-LSL₁₅₀ la pérdida de peso correspondiente a la proteína es de ~15%, lo cual representa 1,65 mg de la biomolécula. En el caso de la pérdida de peso correspondiente a proteína para M8-Agr esta es sólo de un 9% (0,9 mg). Teniendo en cuenta la cantidad de proteína cuantificada

en el ensayo así como el área superficial de las nanopartículas se puede calcular que existen aproximadamente 1,09 LSL₁₅₀ moléculas·nm⁻² de M8 mientras que para M8-Agr este valor es de 2.81 LSL₁₅₀ moléculas·nm⁻². Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de las propiedades químico-físicas de LSL₁₅₀ en complejo con las NPM.

| Muestras | D _n / nm | Área superficial/ nm ² | Moléc. de LSL ₁₅₀ unidas/ mg | Moléc. de LSL ₁₅₀ unidas/ (MW=17365,5 g·mol ⁻¹) | Densidad de moléculas de LSL ₁₅₀ / Moléc.·nm ⁻² |
|--------------------------|------------------------|---|---|---|---|
| M8 (11 mg) | 55 | 5,2E+16 | 1,65 | 5,7E+16 | 1,09 |
| M8-Agr (10 mg) | 267 | 1,1E+16 | 0,9 | 3,1E+16 | 2,81 |

Con el objetivo de estudiar el carácter bioespecífico y reversible de la unión de ambas proteínas (LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂) a las nanopartículas recubiertas de agarosa se realizaron 3 ensayos de unión:

Ensayo A: Incubación de la proteína con las nanopartículas durante 2 horas.

Ensayo B: Incubación de las proteínas con las nanopartículas en presencia de lactosa (0,2 M) durante 2 horas. En este caso la lactosa se uniría a los sitios de unión de carbohidratos que poseen dichas proteínas e impediría su reconocimiento a la agarosa.

Ensayo C: Incubación de la proteína con las nanopartículas durante 1 hora y posterior adición de lactosa (0,2 M) e incubación durante 1 hora. La adición posterior de lactosa debería provocar la disociación de las proteínas unida a las nanopartículas demostrando la reversibilidad del proceso de unión.

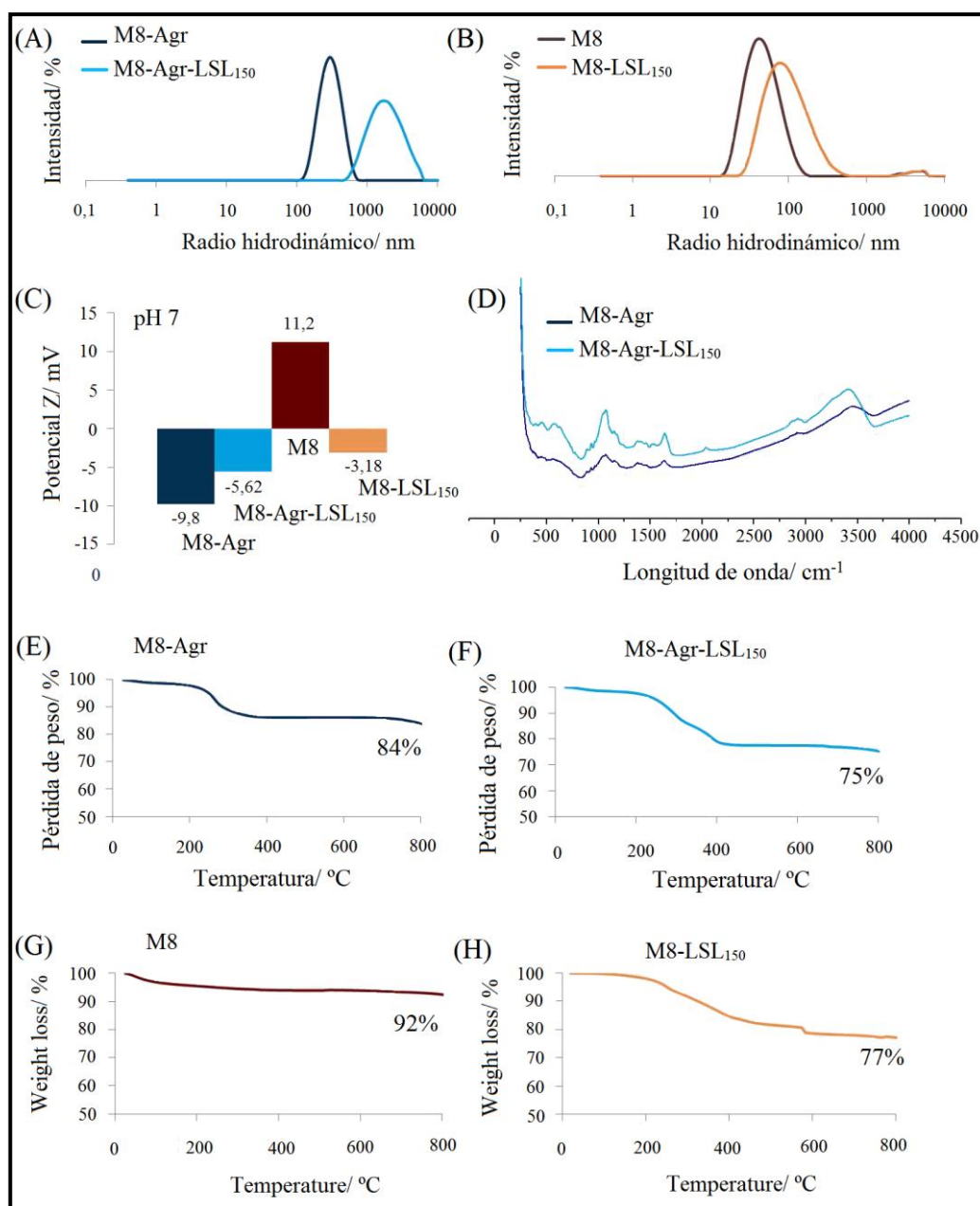


Figura 10. Propiedades coloidales de los complejos NPM-LSL₁₅₀. (A) Radio hidrodinámicos de las NPM recubiertas de agarosa (M8-Agr) libre y en complejo con la proteína. (B) Radio hidrodinámicos de las NPM de maghemita (M8) libre y en complejo con la proteína. (C) Variación de la carga superficial a pH 7 después de la unión de la proteína. (D) Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) de las NPM recubiertas de agarosa libres y en complejo con LSL₁₅₀. (E-H) Análisis termogravimétrico de las NPM antes y después de la unión de la proteína.

En este caso la lactosa se uniría a los sitios de unión de carbohidratos que poseen dichas proteínas e impediría su reconocimiento a la agarosa. Ensayo C: Incubación de la proteína con las nanopartículas durante 1 hora y posterior adición de lactosa (0,2 M) e incubación durante 1 hora. La adición posterior de lactosa debería provocar la disociación de las proteínas unida a las nanopartículas demostrando la reversibilidad del proceso de unión. Se retiraron magnéticamente las NPM y el sobrenadante fue analizado mediante

electroforesis SDS-PAGE. Los geles fueron teñidos con CBB y analizados densitométricamente con el software Image J (Figura 11). En el ensayo A se obtuvieron resultados similares a los descritos anteriormente (Figura 9). LSL₁₅₀ mostró una mayor capacidad de unión a las NPM que LBL₁₅₂. Las proteínas interactúan fuertemente con las nanopartículas de maghemita M8 (proteína libre: LSL₁₅₀ (18%) y LBL₁₅₂ (40%)). También se observó una fuerte unión a las nanopartículas recubiertas de agarosa M8-Agr (proteína libre: LSL₁₅₀ (33%) y LBL₁₅₂ (48%)). La interacción con las partículas MAgr resulta más débil (proteína libre: LSL₁₅₀ (48%) y LBL₁₅₂ (74%)) y prácticamente no se observa unión a las NPM recubiertas de DMSA y aminodextrano (Figura 11A). En el ensayo B se pudo observar que la lactosa impide la unión de las proteínas a las nanopartículas. En particular se modifica la interacción con las NPM recubiertas de agarosa (Figura 11B). En el ensayo C se observa que la unión de las proteínas a las nanopartículas de agarosa puede ser revertida al añadir lactosa al medio (Figura 11C).

3.3. Carácter bioespecífico del sistema LSL₁₅₀-NPM

Con el objetivo de evaluar la factibilidad del diseño de un sistema de purificación de proteínas basado en NPM recubiertas de agarosa para una proteína que contenga un dominio lectina como etiqueta de afinidad se expresó la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, siglas en inglés) fusionada al módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus*: LSL₁₅₀ (LSL₁₅₀-EGFP). Al emplear una etiqueta de afinidad como LSL₁₅₀ estamos buscando que el sistema tenga un carácter bioespecífico y orientado espacialmente dado por el reconocimiento a la agarosa. Además este debe ser un proceso de interacción reversible mediado por lactosa. Para este experimento se emplearon las muestras de NPM M8-Agr y M8, con las cuales ya se había observado una fuerte interacción entre LSL₁₅₀ y la NPM. La construcción genética de LSL₁₅₀-EGFP contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos que conforman el sitio de corte de la endoproteasa TEV (Tobacco Etch Virus, siglas en inglés). Esta secuencia se ubica hacia el extremo C-terminal de LSL₁₅₀ y a continuación se encuentra la secuencia aminoacídica de EGFP que se empleará como proteína modelo.

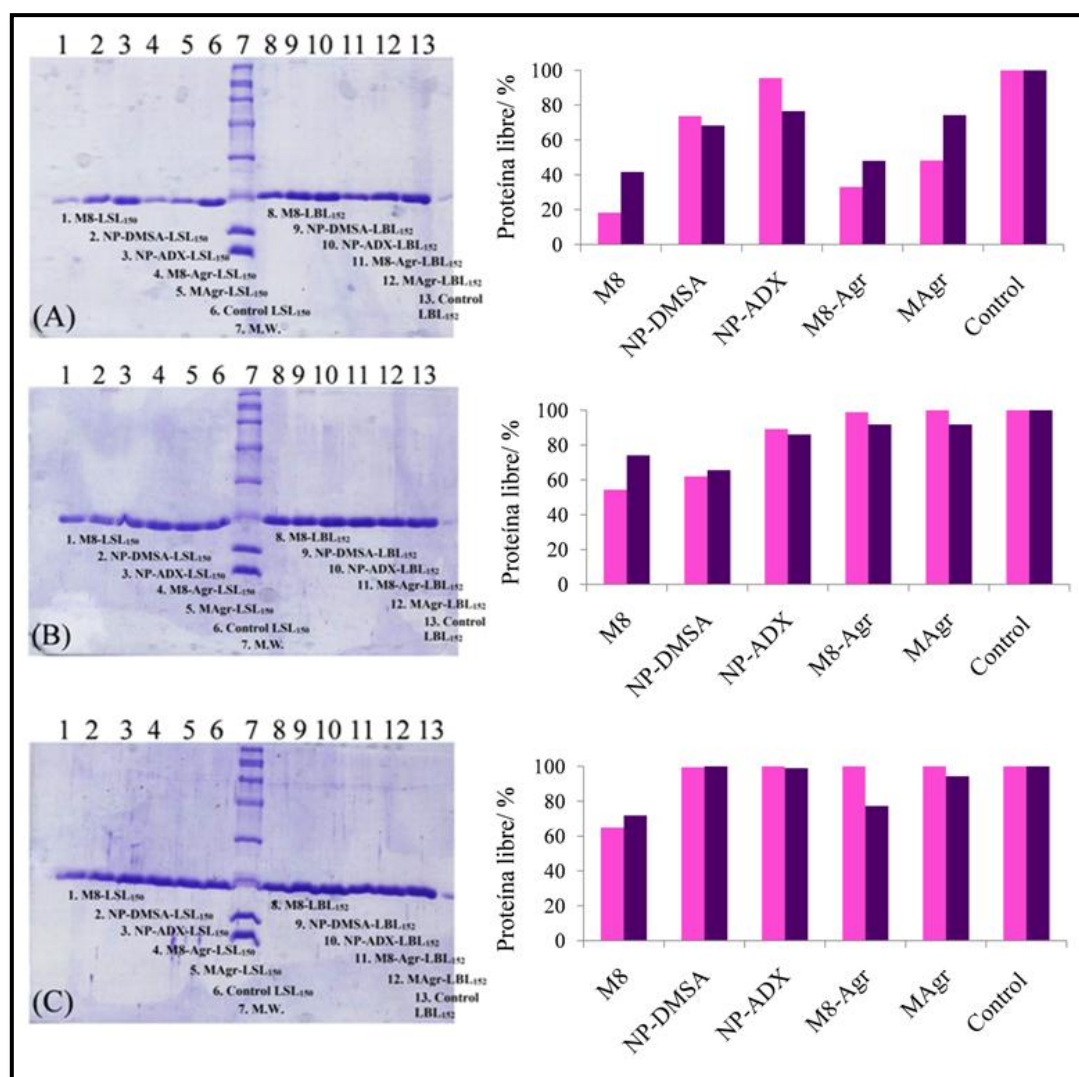


Figura 11. Carácter bioespecífico y reversible en la unión de LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂ a las distintas NPM. (A) **Ensayo A** en medio acuoso. (B) **Ensayo B** en presencia de lactosa. (C) **Ensayo C** en medio acuoso y posterior adición de lactosa al medio. Análisis densitométrico con el software Image J v1.32 para la cuantificación de proteína libre después del ensayo de unión a las NPM (■ LSL₁₅₀ y ■ LBL₁₅₂).

En el panel superior de la Figura 12 se observa una representación esquemática de la interacción de esta proteína con las NPM. En el panel inferior de la figura se observan los resultados obtenidos por electroforesis SDS-PAGE del sobrenadante colectado en varias condiciones experimentales que se describen a continuación. Los geles fueron teñidos con CBB y analizados densitométricamente con el software Image J.

En el carril 1 se observa una banda que se corresponde por su peso molecular con la proteína LSL₁₅₀-EGFP. Esta muestra fue incubada en presencia de M8-Agr y lactosa 0,2 M para prevenir la unión a la nanopartícula y no se añadió TEV. En el carril 2 y 3 se puede observar lo que le ocurre a una muestra similar después de 1 y 12 horas de reacción de la endoproteasa respectivamente. Al realizar esta reacción de corte en presencia de lactosa la proteína no se encuentra unida a las nanopartículas sino libre en el sobrenadante. En

los carriles 2 y 3 se comprueba que la enzima es activa y que al cabo de 12 horas ha digerido prácticamente toda la muestra de LSL₁₅₀-EGFP. Los carriles 4 y 5 se corresponden con muestras de LSL₁₅₀-EGFP incubadas en presencia de M8-Agr después de 1 y 12 horas de reacción de la endoproteasa respectivamente. Estas muestras fueron incubadas en ausencia de lactosa por lo cual en este caso la enzima tiene que realizar el corte en LSL₁₅₀-EGFP unida a M8-Agr. Como se puede observar en estos carriles las bandas correspondientes a LSL₁₅₀-EGFP y a LSL₁₅₀ son muy pequeñas lo cual indica que en este caso sí ocurre interacción entre la proteína y las nanopartículas recubiertas de agarosa. También se observa una fuerte banda correspondiente a EGFP al cabo de una hora de reacción de la proteasa y un incremento de la misma después de 12 horas lo cual indica el proceso de liberación de nuestra proteína modelo. En los carriles 6 y 7 se observa el producto de la acción de TEV después de 1 y 12 horas respectivamente, pero en este caso empleando las NPM de maghemita M8. Después de 1 hora de tratamiento con la enzima prácticamente no se observa proteína libre. Transcurridas 12 horas se ve cómo se ha liberado indistintamente LSL₁₅₀ y EGFP. Esto es indicador que la proteína LSL₁₅₀-EGFP se une a las partículas de maghemita mediante interacciones electrostáticas inespecíficas. Este resultado corrobora los experimentos anteriores de reversibilidad del proceso de interacción mediado por lactosa. Este experimento permite además afirmar que la interacción entre LSL₁₅₀-EGFP se encuentra orientada espacialmente en su interacción con las NP recubiertas de agarosa de forma tal que se une a ella por el módulo lectina y deja accesible al corte con TEV a EGFP.

Con el objetivo de comprobar la direccionalidad de la interacción entre proteínas de fusión del tipo LSL-X y las nanopartículas recubiertas de agarosa, se produjo y purificó la lipasa de *Geobacillus thermocatenolatus* fusionada a LSL (LSL-BTL2). LSL-BTL2 fue incubada durante 90 min en presencia de las nanopartículas recubiertas de agarosa (M8-Agr) y de las nanopartículas de maghemita sin recubrimiento (M8) (Figura 13). Se colectó la fracción correspondiente al sobrenadante después de decantar magnéticamente las nanopartículas y posteriormente se incubó con lactosa (0.2 M) con el objetivo de revertir la unión nanopartículas-proteína. Las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y como se puede observar en los carriles 3 y 5 del gel, la lactosa permite revertir el proceso de unión de la proteína unida a las nanopartículas recubiertas de agarosa, mientras que en el caso de la muestra M8 la proteína continúa inmovilizada en la superficie de las nanopartículas.

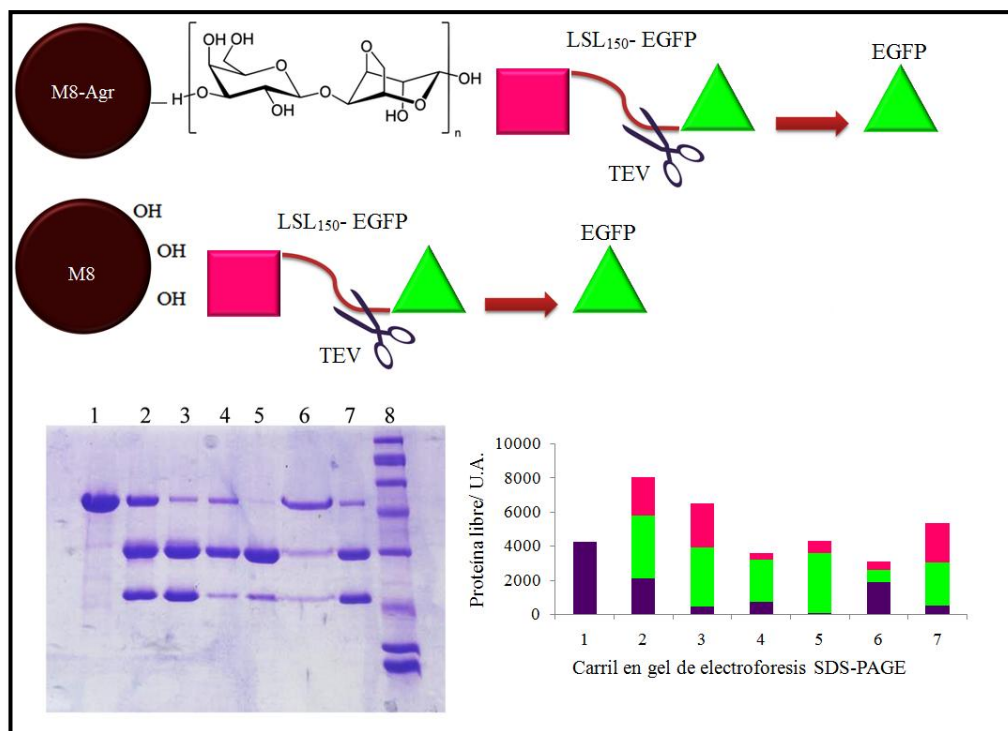


Figura 12. Interacción de LSL₁₅₀-EGFP con las NPM recubiertas de agarosa (■ LBL₁₅₀-EGFP, ■ LSL₁₅₀, ■ EGFP). 1: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa. 2: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 3: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en presencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 4: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 5: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 6: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8 en ausencia de 0.2M de lactosa después de 1 hora de reacción con TEV. 7: LSL₁₅₀-EGFP incubadas con M8-Agr en ausencia de 0.2M de lactosa después de 12 horas de reacción con TEV. 8: Patrón de peso molecular.

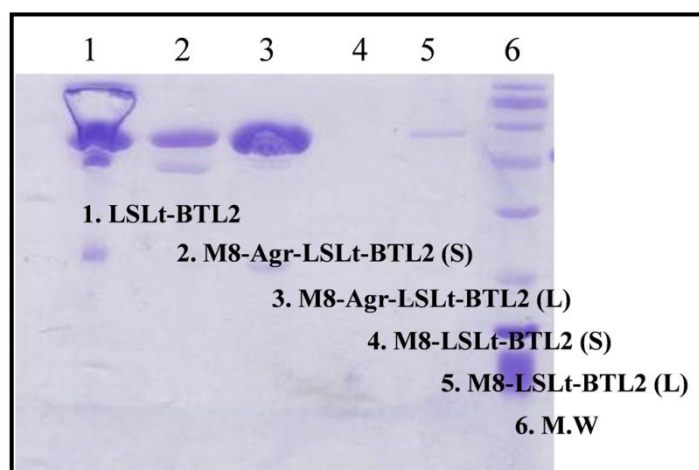


Figura 13. Interacción de LSL-BTL2 con las NPM recubiertas de agarosa (M8-Agr) y sin recubrimiento (M8). 1. Control LSL-BTL2. 2. LSL₁₅₀-BTL2 incubadas con M8-Agr y analizado el sobrenadante. 3. M8-Agr-LSL-BTL2 incubadas en presencia de lactosa 0,2M. 4. LSL₁₅₀-BTL2 incubadas con M8 y analizado el sobrenadante. 5. M8-LSL-BTL2 incubadas en presencia de lactosa 0,2M. 6. Patrón de peso molecular.

La hipótesis de este trabajo es que si la interacción entre LSL-BTL2 está mediada esencialmente por interacciones entre los azúcares de la agarosa y LSL, la enzima BTL2 quedará accesible al medio tras su inmovilización en las nanopartículas y su actividad enzimática quedará únicamente condicionada por la difusión de su sustrato al interior de las mismas. No obstante, teniendo en cuenta que el tamaño de éste es muy pequeño, la actividad de BTL2 no debería depender de si está unida a las NP o está en solución. Eso es lo que se observa en la Figura 14: la actividad de LSL-BTL2 unida a las NP es esencialmente igual a la observada en el sobrenadante de LSL-BTL2 + NP tratadas con lactosa.

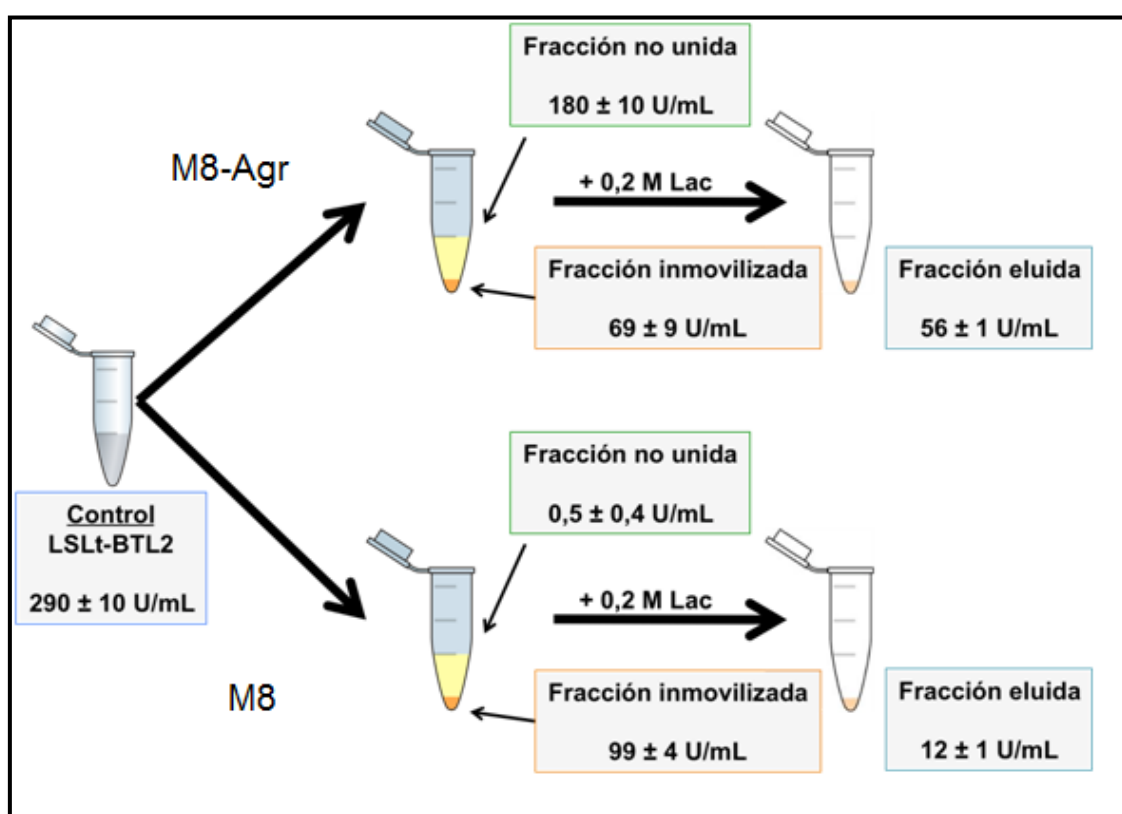


Figura 14. Ensayo de actividad enzimática de la proteína de fusión LSLt-BTL2 inmovilizada sobre las nanopartículas recubiertas con agarosa M8-Agr (arriba) y sobre los núcleos de maghemita sin recubrimiento M8 (abajo). La proteína se incubó con las NPM durante 2 h a temperatura ambiente. La fracción inmovilizada se separó de la fracción soluble, donde permanece la proteína que no se ha unido. Posteriormente, la fracción inmovilizada se trató con 0,2 M lactosa para disociar el complejo lectina:NPM y obtener la fracción eluida. En cada una de las fracciones se midió la actividad hidrolítica de la enzima BTL2.

Estos experimentos permitieron comprobar que el empleo de nanopartículas magnéticas recubiertas de agarosa constituye un método viable para la detección y purificación de proteínas recombinantes fusionadas al módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus* utilizado como etiqueta de afinidad. La

interacción entre la proteína de fusión tiene un carácter bioespecífico, dirigido espacialmente, reversible y accesible al corte con proteasas. Además, al conjugar enzimas al módulo lectina de LSL es posible mantener la actividad enzimática de las mismas sobre el soporte magnético y posteriormente recuperar la proteína manteniendo su actividad biológica.

Capítulo 4. Nanopartículas magnéticas para diagnóstico y tratamiento

- 4.1 *Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes para aplicaciones in vivo*
- 4.2 *Utilización de la técnica de ELISA para la detección y caracterización de nanopartículas modificadas con PEG*
- 4.3 *Evaluación de las nanopartículas como agentes de contraste para imagen por RMN*
- 4.4 *Conjugación de las nanopartículas a dos péptidos bioactivos*

Capítulo 4. Nanopartículas magnéticas para diagnóstico y tratamiento

En muchas ocasiones el éxito de determinada terapia se ha visto disminuido por la inadecuada farmacocinética del fármaco. Una corta vida media en el organismo y su rápida filtración por el riñón provoca que los niveles terapéuticos sólo se alcancen durante cortos períodos de tiempo. Otro problema importante que afecta el uso de determinados medicamentos es su reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Por último, el mantenimiento de la estabilidad químico-física de las formulaciones farmacéuticas constituye también un verdadero reto.

El desarrollo de nuevos mecanismos de liberación de fármacos ha recibido una considerable atención en los últimos años. Se ha descrito una gran variedad de nanoestructuras, como nanopartículas, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas, nanotubos, conjugados poliméricos, microgeles, etc (Park, 2013). Estos sistemas pueden ofrecer ventajas sobre las formulaciones tradicionales, sobre todo cuando permiten que la liberación del fármaco concentrada en un sitio diana y mínimamente invasiva, ya que pueden atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja es que la efectividad del medicamento se ve incrementada mediante el control preciso de la dosis requerida y del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto (Lechuga, 2011). Uno de los sistemas más prometedores en el campo de la Nanomedicina son las nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Estas pueden ser dirigidas específicamente al órgano deseado con la ayuda de un campo magnético y pueden ser convenientemente funcionalizadas con determinadas moléculas o polímeros con el fin de unir fármacos a su superficie y liberarlos en la zona de interés (Jain, 2010).

Sin embargo, existen determinados factores que condicionan el uso de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas: el tamaño de partícula, tipo de recubrimiento superficial y las propiedades magnéticas. En este trabajo se ha estudiado la obtención de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro haciendo hincapié en la obtención de un material con un estricto control del tamaño de partícula en un rango de 8 a 12 nm, que al ser estabilizado en medio acuoso presente tamaños hidrodinámicos <100 nm. El método estudiado para obtener suspensiones de partículas estables es el de intercambio de ligandos con DMSA. Esta estrategia ha permitido obtener unas

nanopartículas con excelentes propiedades magnéticas lo cual determinará su eficiencia como agentes de contraste y la posibilidad de ser utilizadas como un sistema de liberación de fármacos. La modificación superficial con DMSA posibilita la funcionalización con diferentes biomoléculas con actividad terapéutica, así como la unión covalente del PEG, que busca mejorar la farmacocinética y aumentar la biocompatibilidad de dichas nanopartículas.

En este capítulo se describe la optimización del proceso de modificación superficial de nanopartículas con PEG, la caracterización de estos conjugados y el desarrollo de un novedoso método de detección y caracterización de las nanopartículas conjugadas a PEG basado en un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Se ha llevado a cabo la evaluación de las nanopartículas como agentes de contraste para MRI midiendo la relaxividad de las suspensiones, y como transportadores de fármacos, ensayando la conjugación de las nanopartículas a dos péptidos bioactivos.

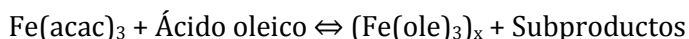
4.1. Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes para aplicaciones *in vivo*

4.1.1. Descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en medio orgánico

La síntesis de las nanopartículas empleadas en este trabajo se llevó a cabo mediante el método de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en medio orgánico descrito en [2.3.4.3]. Este precursor tiene la ventaja de que la síntesis se realiza en una sola etapa de síntesis, lo cual reduce fuentes de variabilidad y requiere también menos tiempo si se compara con otras reacciones que emplean precursores orgánicos de hierro diferentes (Hyeon et al., 2001; Salas et al., 2012).

La reacción transcurre lentamente hasta la formación del complejo $\text{Fe}(\text{ole})_3$ a partir del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y el ácido oleico (Figura 15). Inicialmente la mezcla de los reactivos a temperatura ambiente presenta un color rojo intenso (Figura 15A). Una vez que se aumenta la temperatura hasta alcanzar los 70 °C la mezcla de reacción pasa a tener un color negro debido a la reducción parcial del hierro (Figura 15B). A partir de esta temperatura comienza la generación de los complejos precursores de los núcleos. El grupo carboxilo del ácido oleico forma un complejo de coordinación con el hierro que

puede ser polinuclear (Kwon et al., 2007) (Figura 15C). Alrededor de 200 °C ocurre la reacción de intercambio entre el acetilacetato y el ácido oleico.



La formación del precursor es una reacción de cinética lenta y es un proceso muy relacionado con la etapa de nucleación (Figura 15D). Ya que la reacción no se ve favorecida rápidamente es necesario estabilizarla durante 2 horas con el objetivo de reducir la polidispersidad de la muestra y controlar el tamaño final de las partículas. El complejo se descompondrá en un proceso instantáneo dando lugar a los núcleos magnéticos (Figura 15D) (Kwon et al., 2007). Posteriormente se dan procesos como la maduración de Ostwald, en la que se estrecha la distribución de tamaños, y la recrystalización que mejora el orden cristalino (Figura 15E) (Ostwald, 1896). En esta etapa influye mucho la composición de la mezcla de surfactantes que forman una capa dinámica que es la que controla el proceso de crecimiento de las nanopartículas (Salas et al., 2012). Los surfactantes controlan el proceso donde las moléculas se adsorben y desorben de la superficie de los núcleos. Finalmente la cabeza polar del ácido oleico queda unida al hierro de la superficie de la nanopartícula y la cola apolar de la molécula queda orientada hacia el exterior como barrera de impedimento estérico que evita la interacción entre nanopartículas. De esta forma las nanopartículas quedan estabilizadas en el medio orgánico (Roca et al., 2006).

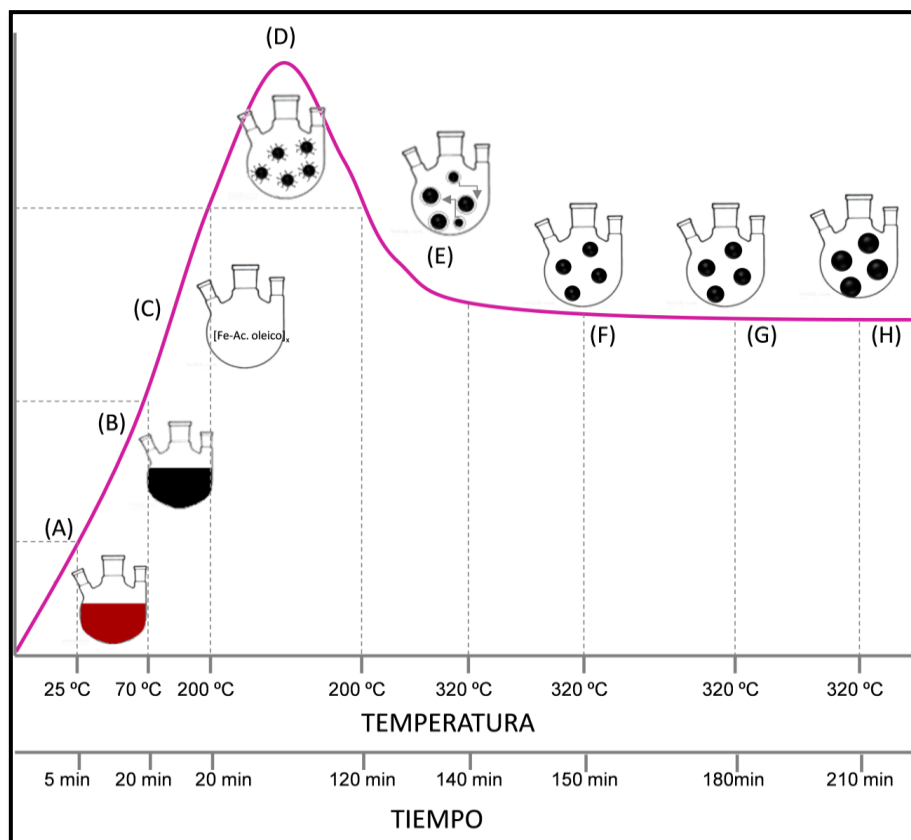


Figura 15. Esquema del avance de la reacción descomposición térmica del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en medio orgánico y en presencia de surfactantes.

En este trabajo se observó la influencia del tiempo de reacción durante la etapa de crecimiento o maduración. Para esta etapa se estudiaron tres periodos de tiempo (Figura 16A: 30 minutos, B: 60 minutos y C: 90 minutos).

Los resultados obtenidos muestran que al aumentar el tiempo de maduración las nanopartículas incrementan su tamaño final ya que se completa al máximo el proceso de maduración de Ostwald y se obtienen partículas más grandes y homogéneas a medida que aumenta el tiempo de reacción (Figura 16). De esta forma se obtuvieron partículas de 7, 10 y 12 nm respectivamente lo cual fue confirmado a partir del análisis de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Como se puede observar en el histograma de tamaño, este método permite la obtención de nanopartículas con un estricto control del tamaño y elevada monodispersidad ($\sigma = 0,15$).

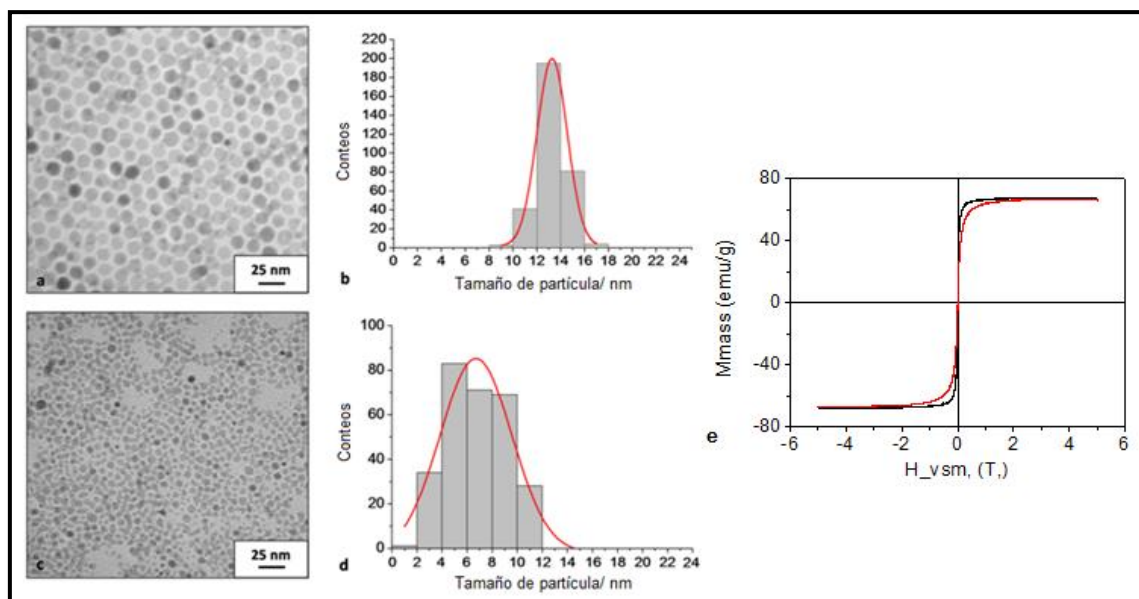


Figura 16. Imágenes de TEM de partículas de magnetita de diferentes tamaños obtenidas al variar el tiempo de reacción. A: 90 minutos y C: 30 minutos. B y D: Histograma de tamaños correspondiente. E) Curvas de magnetización a 250K (línea roja: D7nm, línea negra: D12nm).

4.1.2. Conjugación a diferentes polímeros basados en polietilenglicol

Sin embargo las nanopartículas obtenidas se encuentran recubiertas de ácido oleico lo cual les confiere un carácter hidrofóbico. Se requiere entonces una segunda etapa de reacción para la eliminación del ácido oleico y la transferencia a medio acuoso de las nanopartículas.

Existen multitud de métodos para estabilizar las partículas de magnetita en agua, ya sea por repulsión estérica y/o electrostática. En este trabajo se estudió una reacción muy sencilla que permite la sustitución de los surfactantes que tras la síntesis de las nanopartículas quedan unidos a su superficie (ácido oleico y oleilamina) por otra molécula responsable de estabilizar a las nanopartículas en agua: el ácido dimercaptosuccínico. El DMSA a través de su grupo $-CHSH-COOH$ constituye un buen agente quelante y permite la estabilización del ferrofluido en medio acuoso (NP-DMSA) (Bee et al., 1990; Fauconnier et al., 1997; Massart et al., 1995).

Debido al interés en que las partículas queden modificadas con un polímero como el PEG se llevó a cabo una tercera etapa de reacción para unir el polímero. Para ello se estudió la conjugación de diferentes polímeros basados en polietilenglicol: O-(2-aminoetil) polietilenglicol, (750 y 5000 Da) (PEG-NH₂), O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, (2000, 6000 ó 20000 Da) (PEG-(NH₂)₂), y poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol)-poli(propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), 1900 Da (PEG-Prop-(NH₂)₂) (Figura 17). Sin

embargo la reacción entre los grupos aminos del PEG y carboxilos del DMSA no ocurre de forma espontánea, con lo cual se hace necesario un agente que haga favorable este acoplamiento. El uso de carbodiimidas, especialmente la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es la más utilizada en este tipo de reacciones ya que consiste en un método sencillo y permite la funcionalización de las nanopartículas en medio acuoso (Shen et al., 2009). El EDC reacciona con el grupo carboxilo del DMSA formando un grupo O-acilisourea y este proceso se conoce como “activación”. Esta estructura sufre una aminólisis por parte de la amina para dar lugar a la amida (Nakajima and Ikada, 1995; Sheehan and Hess, 1995).

Este procedimiento ha sido ampliamente descrito en la funcionalización de nanopartículas que se han conjugado a diferentes residuos de PEG (Kohler et al., 2006; Lattuada and Hatton, 2007; Sun et al., 2010; Sun et al., 2006). Sin embargo es una reacción que requiere un cuidadoso ajuste del pH. En nuestro caso ajustamos el pH de la reacción entre 5,5-6 buscando una mayor estabilidad para la carbodiimida y permitir la activación de los grupos carboxilos. También fraccionamos el proceso de adición de la carbodiimida ya que esta se hidroliza con el tiempo, y se ha observado que la adición en exceso de carbodiimida a la reacción puede producir la precipitación de las nanopartículas (Shen et al., 2009).

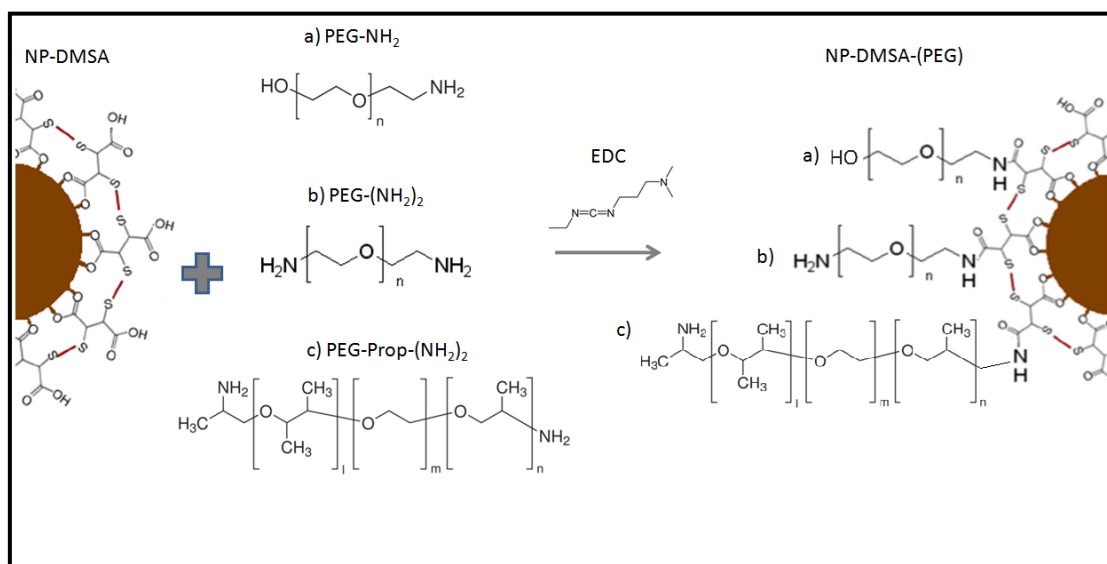


Figura 17. Esquema de la reacción de conjugación de las NP-DMSA a los diferentes polímeros basados en PEG: A) O-(2-aminoetil) polietilenglicol, (750 y 5000 Da) (PEG-NH₂), B) O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, (2000, 6000 ó 20000 Da) (PEG-(NH₂)₂), y C) poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol)-poli (propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), 1900 Da (PEG-Prop-(NH₂)₂).

4.1.3. Caracterización químico-física de las nanopartículas conjugadas a PEG

En la Figura 18 se pueden observar las imágenes de microscopía electrónica de la muestra D12 en hexano (Figura 18A) y posteriormente transferida a agua y derivatizada con 3 polímeros diferentes: PEG-NH₂ (750 Da), PEG-(NH₂)₂ (2000 Da), y PEG-Prop-(NH₂)₂ (1900 Da) (Figura 18 B-D). Las partículas transferidas a medio acuoso siguen conservando el mismo tamaño y forma. Sin embargo, la transferencia de las partículas a agua rompe el autoensamblaje presente cuando estaban recubiertas de ácido oleico. Al estar recubiertas de una molécula más pequeña y debido al propio proceso de intercambio de ligandos, no existe suficiente impedimento estérico para evitar la atracción entre partículas ya sea por fuerzas de van der Waals o interacciones magnéticas. Las partículas forman agregados de ~50-100 nanopartículas, de un tamaño aproximado de 50 nm, lo cual es consistente con los datos de radio hidrodinámico obtenidos por DLS.

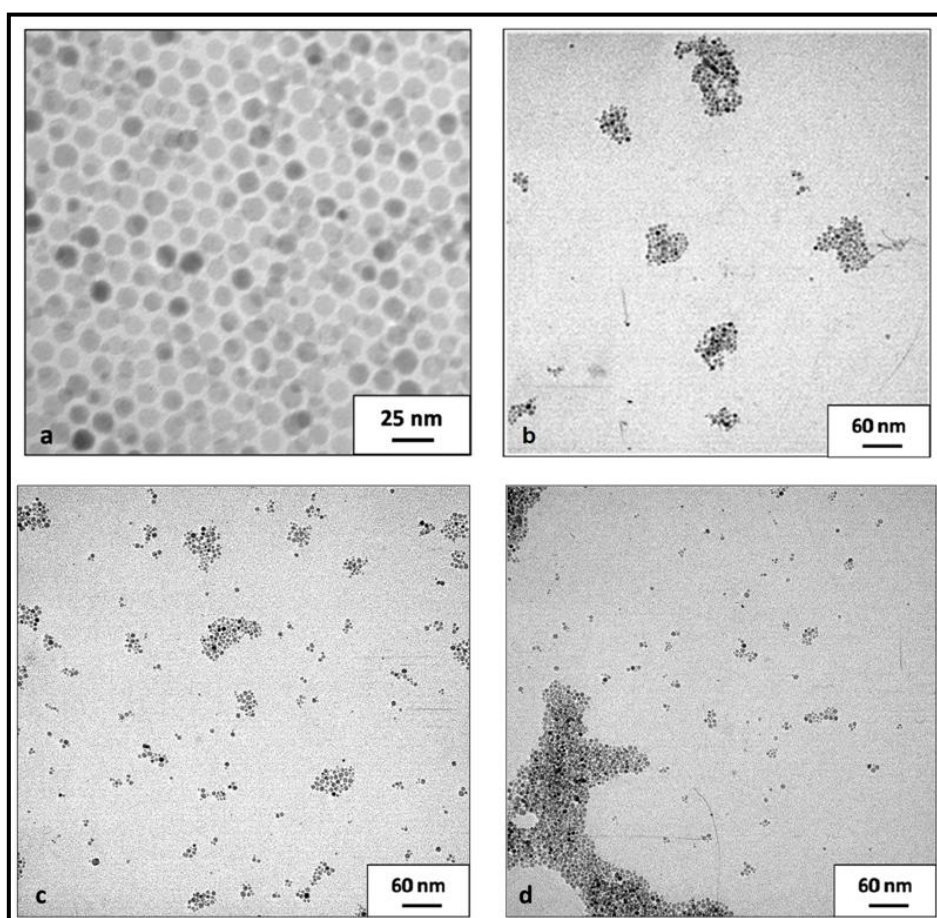


Figura 18. Imágenes de TEM de las nanopartículas: A) D12 B) NP-PEG-NH₂ 750 Da, C) NP-PEG-(NH₂)₂ 2000 Da, y D) NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ 1900 Da.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad coloidal y el grado de agregación de las muestras después de la reacción de conjugación a PEG se realizaron medidas de radio hidrodinámico y potencial Z en función del pH (Figura 19, Tabla 5). El tiempo de duración de la reacción fue de 30 horas y al finalizar la reacción las muestras fueron dializadas durante 72 h con el objetivo de eliminar el polímero no unido. En la Tabla 5 se resumen los valores de radio hidrodinámico e índice de polidispersidad ($PDI = \text{desviación estándar} / \text{media}$) de las muestras D7 y D12 transferidas a medio acuoso y modificadas con diferentes PEGs en función de la intensidad que dispersan las partículas. Para ambas muestras de partida se observa un incremento del radio hidrodinámico después de la conjugación a los distintos residuos de PEG de 22 a ~27 nm y de 42 a ~56 nm para las muestras de 7 y 12 nm de núcleo de hierro respectivamente. El grado de polidispersidad (PDI) se mantiene inferior a 0,25.

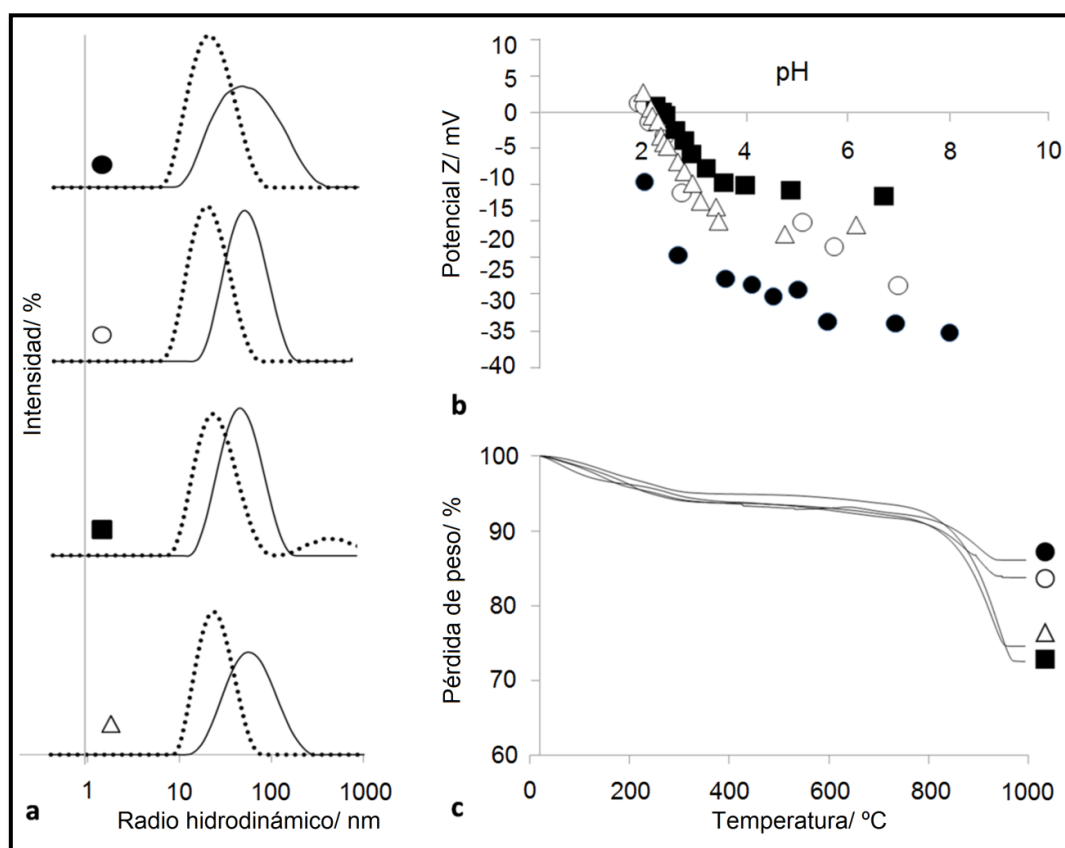


Figura 19. Propiedades coloidales de las NP-DMSA de 7 y 12 nm conjugadas a distintas cadenas de PEG. A) Valores de radio hidrodinámico para las NP-DMSA de 7 nm (línea de puntos) y 12 nm (línea continua). B) Evolución del potencial Z en función del pH para las nanopartículas de 12 nm después de conjugar a las distintas cadenas de PEG. C) Análisis termogravimétrico de las muestras de 12 nm. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [△] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).

Tabla 5. Resumen de los radios hidrodinámicos (Dh) y PDI de las suspensiones acuosas de nanopartículas de 7 y 12 nm conjugadas a distintos PEGs.

| Muestras | D7 | | D12 | |
|---|---------------------|------|---------------------|------|
| | D _h (nm) | PDI | D _h (nm) | PDI |
| NP-DMSA | 22 | 0,25 | 43 | 0,24 |
| NP-PEG-NH ₂ | 23 | 0,24 | 56 | 0,25 |
| NP-PEG-(NH ₂) ₂ | 27 | 0,30 | 49 | 0,27 |
| NP-PEG-Prop-(NH ₂) ₂ | 22 | 0,23 | 52 | 0,22 |

El análisis de la evolución del potencial Z en función del pH permitió evaluar la variación de la carga superficial neta después de la conjugación a PEG. Las NP-DMSA presentan valores de potencial Z de -35 mV a pH 7 debido a la contribución de los grupos COOH del DMSA. Sin embargo, después de la reacción de conjugación se observa una disminución de la carga superficial neta de las nanopartículas hacia valores entre -10 y -15 mV. Esto es debido a la disminución de grupos carboxilos libres en la superficie de las nanopartículas por encontrarse comprometidos en el enlace amida con el PEG, además del efecto de apantallamiento de cargas característico que se observa en los compuestos PEGilados. La diferencia de carga superficial entre las distintas muestras PEGiladas es una muestra de la eficiencia de la reacción de conjugación a cada uno de los residuos de PEG. En el caso de las NP-PEG-NH₂ estas presentan valores de potencial Z ~ -20 mV, mientras que NP-PEG-(NH₂)₂ la carga superficial neta a pH 7 es de -13 mV. Esto podría deberse a una mayor reactividad de la molécula de PEG bifuncional (diaminado) sobre el residuo monoaminado. Estos resultados fueron corroborados a partir del análisis termogravimétrico de las muestras donde se cuantificó el número de moléculas de PEG unidas a las nanopartículas (Figura 19C). La muestra de NP-DMSA revela una pérdida de peso de ~13%, debido a la eliminación del agua fisiadsorbida a la superficie y al recubrimiento con DMSA. La muestra de NP-PEG-NH₂ presentó una pérdida total de peso del 17%, mientras que las muestras conjugados con PEG-(NH₂)₂ y PEG-Prop-(NH₂)₂ mostraron una pérdida de peso del 28 y 25%, respectivamente.

Esto indica una menor eficiencia de conjugación para el PEG aminado (4% en peso), lo cual es corroborado por los valores de potencial-Z donde se observa para esta muestra la menor modificación de la carga superficial con respecto a las otras. Las partículas modificadas con PEG diaminado, sin embargo mostraron una mayor cantidad de polímero conjugado (~25%) y una notable reducción en la carga superficial, lo que indica una mayor eficiencia de la reacción. Esto es debido probablemente a la presencia de más grupos

aminos reactivos capaces de actuar en la reacción de conjugación. En todos los casos, la pérdida de peso se llevó a cabo en dos pasos, uno a 200-400 °C asociada a la quema del polímero y otro a 900 °C, probablemente asociados a restos del DMSA y del polímero fuertemente unidos a la superficie de la nanopartícula.

Esta pérdida de peso a 900 °C llamó significativamente la atención, por lo cual se realizaron las mismas mediciones termogravimétricas bajo flujo de oxígeno con el objetivo de aumentar la velocidad de conversión a CO₂ de toda la materia orgánica de la muestra. Sin embargo, sólo se observó que la pérdida de peso inicial de la curva ocurría en un rango más estrecho de temperatura, pero permanecía el mismo comportamiento a 900 °C. Este comportamiento podría ser debido a la presencia del DMSA, el cual también se emplea como una agente que incrementa la resistencia al calor de los polímeros (Berenbaum et al., 1976). El DMSA parece reaccionar con fragmentos de polímeros producidos después del calentamiento, lo que retarda aún más la fragmentación y vaporización del componente orgánico. El contenido de PEG de las muestras también se analizó por análisis elemental comparando los resultados con muestras patrones preparadas a partir de la mezcla de cantidades conocidas de PEG y nanopartículas. Teniendo en cuenta el área superficial de las nanopartículas y la cantidad de polímero cuantificado, se ha podido determinar la presencia de aproximadamente ~2 moléculas de PEG/ nm² de nanopartícula (NP-PEG-NH₂ 750 Da: 2,2 moléculas de PEG/ nm², NP-PEG-(NH₂)₂ 2000 Da: 1,9 moléculas de PEG/ nm², NP-PEG-Prop(NH₂)₂ 1900 Da: 1,7 moléculas de PEG/ nm²). Conocidos los sitios activos en la superficie de las partículas, es posible realizar un diseño controlado de funcionalización adicional con biomoléculas, fármacos o agentes activos.

La modificación de las nanopartículas fue también confirmada por FTIR (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier). Los espectros IR de DMSA y moléculas de PEG se incluyeron para realizar la comparación de las bandas (Figura 20A-H). Para la muestra de NP-DMSA, el espectro se compone de intensas bandas asignadas a la vibración del enlace (Fe-O) en la región de 550-600 cm⁻¹ (Roca et al., 2007), y un pico ancho entre 3000-3500 cm⁻¹ que es debido a la presencia de grupos OH del agua adsorbida a la superficie. Esta vibración también es característica de grupos NH₂ lo cual se puede observar en las muestras conjugadas a los PEG aminados (Barrera et al., 2009; Lattuada and Hatton, 2007). Después de la reacción de conjugación a los polímeros, se observó la aparición de bandas a 1354 y 1102 cm⁻¹, indicando la vibración asimétrica y simétrica de estiramiento del enlace C-O-C, así como la vibración fuera del plano de la flexión de los enlaces C-H de las cadenas de PEG a 956 cm⁻¹ (Amici et al., 2011; Amstad et al., 2009). Una banda intensa apareció entre 1000-1200 cm⁻¹ después de la reacción de conjugación, lo que es indicativo de la presencia de aminos alifáticos (C-N). También se observó la

presencia de enlaces amida con los grupos carbonilo a 1640 y 1556 cm^{-1} respectivamente lo cual es indicador de la unión covalente del PEG a las nanopartículas (Kohler et al., 2006; Sun et al., 2010).

Con el objetivo de determinar el carácter covalente del enlace entre el PEG y las NP y no una simple unión por adsorción superficial, se llevó a cabo un experimento control de la reacción en presencia/ausencia de EDC (Figura 20 I-K). La aparición de bandas entre $2800\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ en las muestras donde se haya presente la carbodiimida y puede ocurrir la reacción de conjugación, indica que el PEG se ha unido con éxito sobre la superficie de las partículas de forma covalente mediante la formación de un enlace amida (Barrera et al., 2009). Este es un dato de gran importancia ya que un factor que afecta la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de las nanopartículas es la fortaleza del enlace entre el recubrimiento y la partícula. Un ejemplo de ello son las nanopartículas recubiertas con dextrano, que al ser administradas *in vivo*, el polímero se desorbe de la nanopartícula facilitando su agregación y reconocimiento por los macrófagos (Creixell et al., 2010).

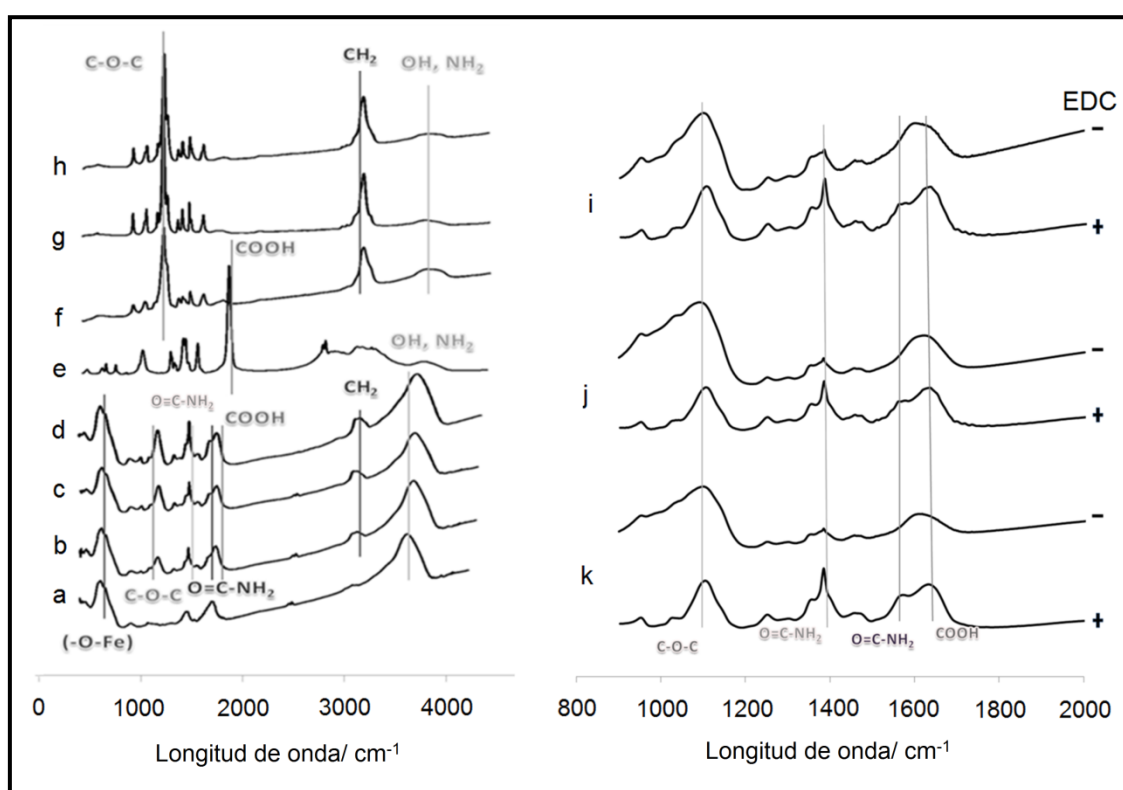


Figura 20. Izquierda, espectro infrarrojo de (a) NP-DMSA, (b) NP-DMSA-PEG-NH₂, (c) NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂, (d) NP-DMSA-PEG-Prop-(NH₂)₂, (e) DMSA, (f) PEG-NH₂, (g) PEG-(NH₂)₂, (h) PEG-Prop-(NH₂)₂. Derecha, espectro infrarrojo de los productos de reacción de las NP con los diferentes polímeros en ausencia (-) o presencia de EDC (+): (i) NP-DMSA-PEG-NH₂, (j) NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂, (k) NP-DMSA-PEG-Prop-(NH₂)₂.

Los datos obtenidos de carga superficial neta, análisis elemental y termogravimétrico así como de espectroscopía infrarroja permiten afirmar que la reacción transita por la formación de un enlace amida debido a una sustitución nucleofílica, con el EDC como activador del grupo carboxilo. También se estudió la influencia de algunos parámetros en el proceso como puede ser la cantidad de polímero adicionada y el tiempo de reacción necesario para obtener el máximo recubrimiento polimérico. Para ello se estudió la adición del polímero en un rango de cantidades entre 0 y 2 mg por mg de NP en la reacción. La reacción fue monitoreada por la medición de la carga superficial a diferentes tiempos hasta las 30 h. Los datos obtenidos para las partículas de 12 nm se resumen en la Figura 21 A y C.

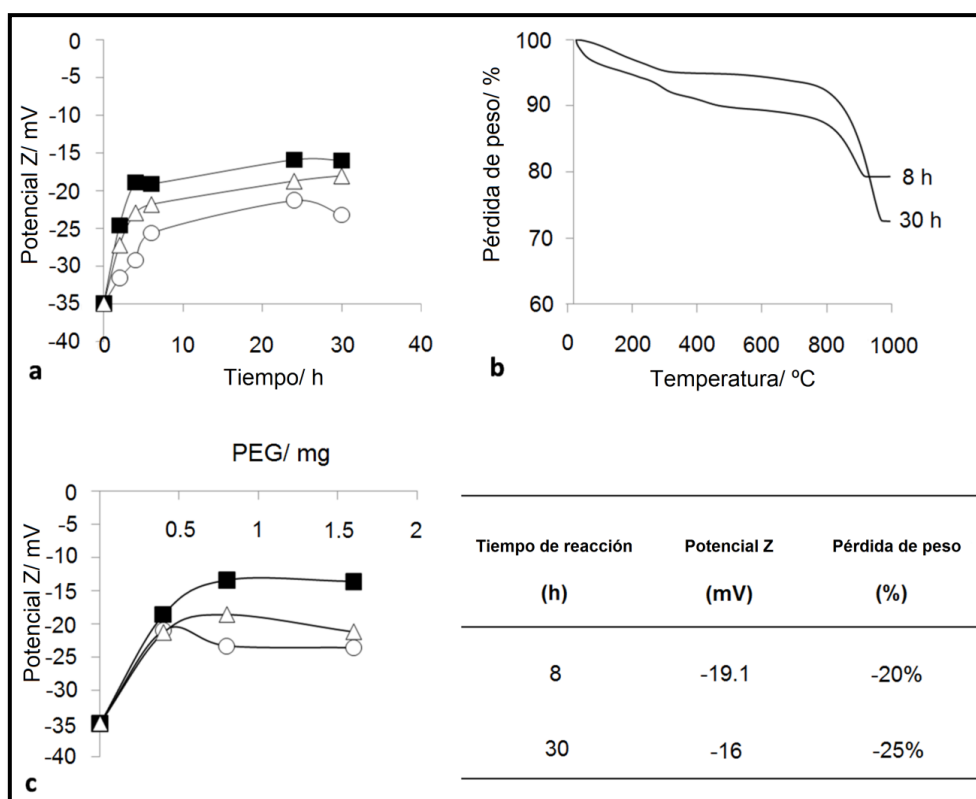


Figura 21. A) Variación de la carga superficial de suspensiones acuosas de nanopartículas de 12 nm modificadas con diferentes derivados de PEG en función del tiempo de reacción. B) Curvas termogravimétricas (TGA) para NP-DMSA-PEG-(NH₂)₂ a 8 y 30 horas de tiempo de reacción. C) Variación de la carga superficial de suspensiones acuosas de nanopartículas de 12 nm modificadas con diferentes derivados de PEG en función de la cantidad de reactivo añadido. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [△] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂)

En las 3 reacciones de conjugación estudiadas a los diferentes PEGs se observó una disminución notable en la carga superficial después de las 4 horas de reacción, lo que

indica que este intervalo de tiempo es esencial en el proceso de conjugación. A partir de este tiempo no se observan cambios en la carga superficial de las NP conjugadas a PEG (Figura 21 A). Esto es probablemente debido al impedimento estérico causado por las cadenas del PEG que ya han reaccionado con los grupos activos de la superficie de las NP, lo cual disminuye la accesibilidad de los COOH que quedan libres e impide la llegada de nuevas cadenas de PEG. Este es un fenómeno característico de las reacciones de PEGilación, debido a las características de este polímero. Las cadenas del PEG en medio acuoso presentan una elevada solvatación, movilidad y flexibilidad dando un lugar a un fenómeno específico conocido como “efecto sombrilla” que va a impedir estéricamente la llegada hasta los grupos reactivos de más cadenas de PEG, pero que le confiere al conjugado NP-PEG un mayor apantallamiento de sus cargas superficiales y una mayor estabilidad coloidal.

Después de 8 h de reacción no se observa una marcada modificación de la carga superficial hasta las 30 horas. Estos resultados son consistentes con los análisis de termogravimetría, que mostraron que la pérdida de peso que ocurre entre muestras de 8 y 30 h difiere sólo en un 5% (Figura 21B). El tiempo de reacción óptimo para este procedimiento debe ser por tanto de entre 8 y 10 h. Por otro lado, el aumento de la cantidad de PEG en la reacción entre 1:0,4 y 1:1,6 (mg NP: mg PEG) conducen a la saturación de la reacción y al establecimiento de una meseta en el comportamiento de la carga superficial (Figura 21C). Esto es indicador de que el número de moléculas de PEG que se puede enlazar a la superficie NP está restringido, por razones de impedimento estérico entre las cadenas de PEG y de accesibilidad limitada a los grupos funcionales de la superficie de las NP-DMSA.

La aplicaciones de las nanopartículas en biomedicina requiere una elevada estabilidad de estas en soluciones con alta concentración de sales y proteínas (Yanli Liu and Feldheim, 2007). Para ello, se estudió la estabilidad de las partículas en función de la fuerza iónica mediante la medición del radio hidrodinámico a diferentes concentraciones PBS (Figura 22). Las soluciones coloidales fueron inicialmente estables (durante 1 hora) en PBS 1X (0,01 M Na_3PO_4 y 0,154 M NaCl), pero el tamaño hidrodinámico aumentó con el tiempo, así como al aumentar la concentración de sales del medio. El aumento del radio hidrodinámico de las NP observado a mayores concentraciones de PBS podría ser debido a la compactación de la cadena de polímero y la disminución de la distancia entre los núcleos magnéticos, lo cual conduce a la agregación. Para probar esta hipótesis, se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS), siempre por debajo de la concentración micelar crítica del surfactante, a las muestras en PBS a pH 7 (Fuguet et al., 2005). La estructura del SDS consta de una cadena carbonada con una cabeza polar que le permitiría intercalarse entre

las cadenas de PEG, extendiéndolas y aumentando la estabilidad de las nanopartículas. En presencia del SDS, el radio hidrodinámico de las partículas modificadas con PEG aumentó ligeramente pero se mantuvo siempre por debajo de 100 nm (Figura 22B-D), mientras que las partículas recubiertas con DMSA mostraron un incremento significativo en el radio hidrodinámico al aumentar la concentración de sales en el medio (Figura 22A). El SDS no tuvo ningún efecto sobre el radio hidrodinámico de las nanopartículas recubiertas sólo con DMSA, que agregan a altas concentraciones de PBS, independientemente de la presencia de SDS.

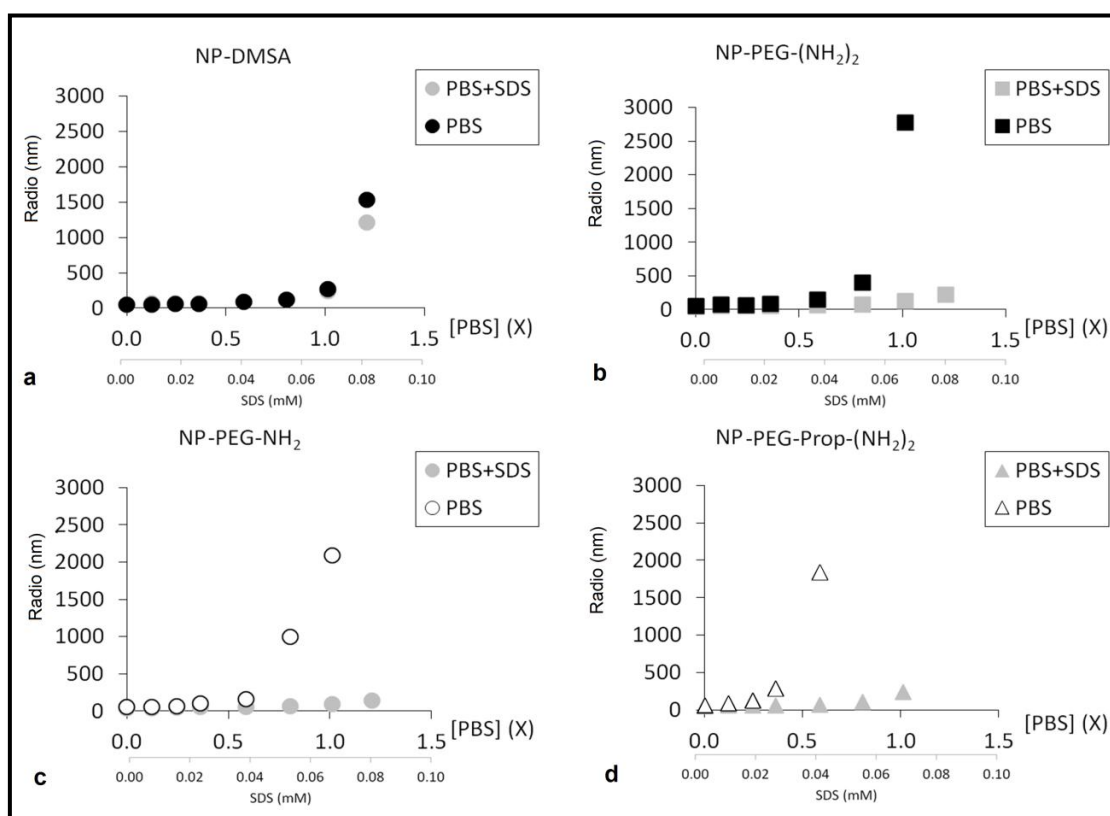


Figura 22. Radio hidrodinámico de las suspensiones de nanopartículas después de una hora a diferentes concentraciones de PBS y SDS. ([●] NP-DMSA, [○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [△] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).

4.2. Utilización de la técnica de ELISA para la detección y caracterización de nanopartículas modificadas con PEG

La aplicación clínica de las nanopartículas modificadas con PEG constituye una alternativa muy prometedora en el campo de la biomedicina. Sin embargo esta requiere

también del desarrollo de métodos analíticos que permitan una caracterización exhaustiva de la estabilidad del producto *in vitro*, así como su detección durante el proceso de metabolización y biotransformación *in vivo* (Cheng et al., 2012; Eaton, 2011). En los últimos 60 años se han desarrollado numerosos métodos analíticos para la detección y cuantificación de compuestos PEGilados: técnicas colorimétricas, cromatografía de alta resolución (HPLC), ensayos de radiomarcaje, inmunodetección, etc (Cheng et al., 2012). Sin embargo estas técnicas sólidamente establecidas para la caracterización de biomoléculas PEGiladas no ha tenido el mismo desarrollo en la caracterización de nanopartículas magnéticas conjugadas a PEG. Hasta ahora las nanopartículas magnéticas en biomedicina se han estudiado mediante una conjugación de métodos magnéticos y no magnéticos, pero que analizan más bien el componente metálico de la nanopartícula (Gu et al., 2012; Levy et al., 2011; Tseng et al., 2012). Los métodos no magnéticos están basados en la detección del hierro por técnicas de análisis elemental, métodos colorimétricos de detección del complejo de hierro-ferrocina o ensayos de tinción con Azul de Prusia. Los métodos magnéticos están dirigidos al seguimiento de la variación de las propiedades magnéticas: obtención de curvas de magnetización o análisis de imagen por resonancia magnética nuclear. Sin embargo estas técnicas clásicas de caracterización de nanopartículas magnéticas en biomedicina no son capaces de evaluar la estabilidad e integridad del recubrimiento de las nanopartículas.

La obtención de anticuerpos contra PEG ha permitido el desarrollo de ensayos tipo ELISA muy sensibles para la detección de biomoléculas PEGiladas. Estos anticuerpos se han empleado exitosamente en la caracterización de productos biotecnológicos como: Mircera, Pegasys, PEG-Intron or Neulasta (Lamon et al., 2009; Su et al., 2010). Todos ellos son proteínas PEGiladas aprobadas por la FDA para su uso clínico. El diseño de un ensayo de ELISA sándwich empleando anticuerpos anti-PEG permite la detección directa de la molécula de PEG independientemente de donde se encuentre unida. Este tipo de ensayos se ha utilizado para la detección a muy bajas concentraciones de proteínas PEGiladas ($0,32-1,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), liposomas funcionalizados con PEG ($0,32-1,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) o quantum dots modificados con este polímero ($0,36-2,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Cheng et al., 2005; Su et al., 2010). Sin embargo, esta técnica no se ha utilizado en la caracterización de nanopartículas de óxido de hierro conjugadas a polietilenglicol en ensayos *in vitro* o *ex vivo*, a pesar de la importancia que estas nanopartículas están ganando en el campo de la nanobiomedicina. En colaboración con la Dra. Leonor Kremer (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC) se ha desarrollado un ensayo tipo ELISA sándwich que emplea el mismo anticuerpo anti-PEG para la captura y detección de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con este polímero (Figura 23A).

Las muestras de NP-PEG-NH₂ 750 Da, NP-PEG-(NH₂)₂ 2000 Da y NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ 1900 Da fueron analizadas mediante este ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 20B. Las NP-PEG-(NH₂)₂ pueden ser detectadas empleando este tipo de ensayo hasta concentraciones de 1,23 µg/mL, mientras que las nanopartículas conjugadas al PEG-NH₂ 750 Da o al copolímero PEG-Prop-(NH₂)₂ no son reconocidas por el anticuerpo. Resultados similares se han obtenido con otros anticuerpos anti-PEG, que no son capaces de detectar compuestos PEGilados donde el terminal de la molécula es un grupo metoxi como sucede en el caso de las NP-PEG-NH₂ (Su et al., 2010). También es posible que la estructura mixta de polientilenglicol-propilenglicol no sea reconocida por este anticuerpo con lo cual falla en la detección de las NP-PEG-Prop-(NH₂)₂.

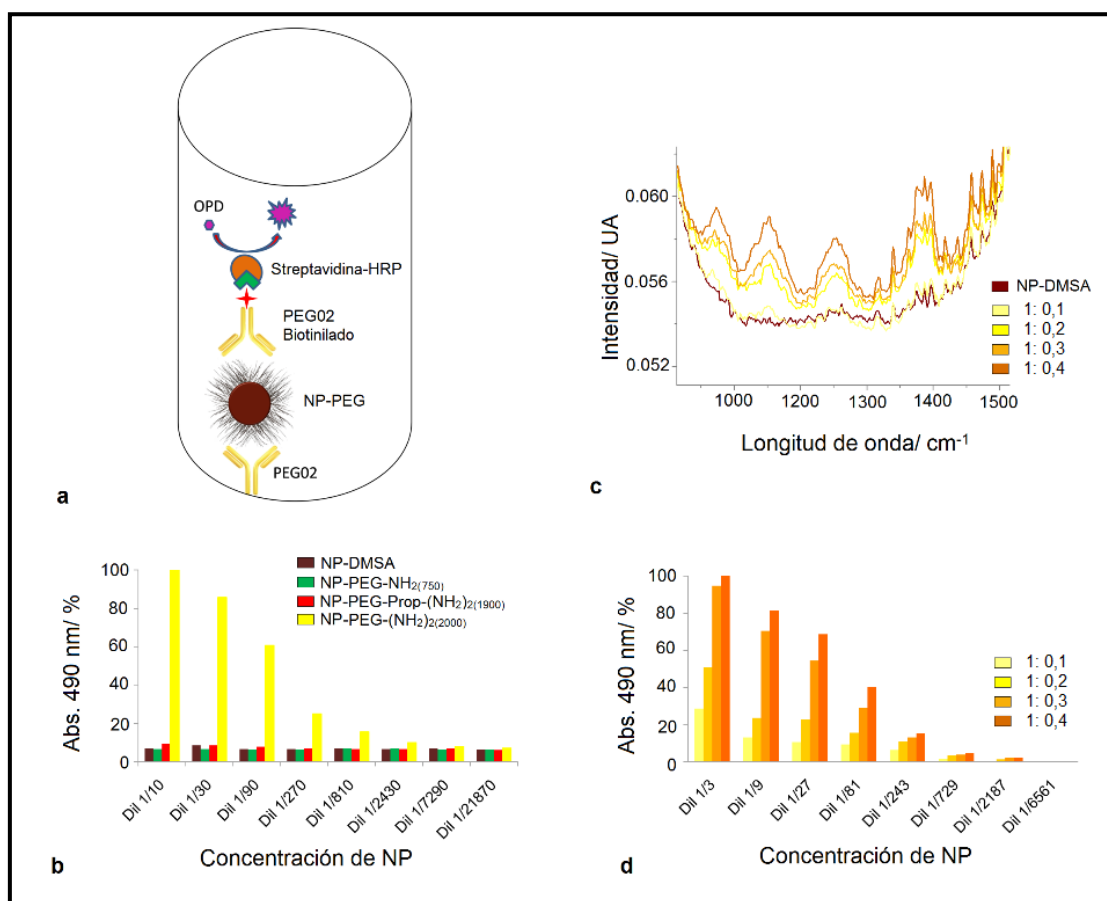


Figura 23. A) Representación esquemática del ensayo tipo ELISA desarrollado para la caracterización de nanopartículas conjugadas a PEG. B) Detección de NP conjugadas a PEG de cadena corta mediante ELISA. C) Espectro infrarrojo de NP conjugadas a PEG-(NH₂)₂ 2000 Da empleando cantidades crecientes del polímero en la reacción. Detección por ELISA de NP conjugadas a PEG-(NH₂)₂ 2000 Da empleando cantidades crecientes del polímero en la reacción.

En experimentos anteriores habíamos determinado que a partir de una proporción de 1:0,4 (mg NP: mg PEG) en la reacción se alcanzaban condiciones saturantes y no se

lograba una mayor modificación superficial (Figura 21C). Sin embargo resulta interesante poder establecer un límite inferior en la capacidad de detección del PEG unido a las nanopartículas. Para ello se prepararon reacciones donde disminuía la relación másica NP: PEG (1: 0,4; 1:0,3; 1: 0,2; 1:0,1). El análisis por espectroscopía infrarroja de estos patrones permitió comprobar que la intensidad de las bandas correspondientes a la vibración del enlace C-O-C del PEG (1354 and 1102 cm^{-1}) tomado como referencia disminuye en estas condiciones de reacción estudiadas (Figura 21C). El análisis por ELISA de dichos patrones corroboró estos resultados, con la ventaja adicional de poder detectar diferencias en el grado de funcionalización de las nanopartículas a concentraciones $\sim 4,1 \mu\text{g/mL}$, lo cual es imposible por espectroscopía infrarroja que requiere una cantidad limitante de muestra en el orden de los miligramos para el análisis.

También se estudió la capacidad de detección del anticuerpo PEG02 para nanopartículas conjugadas a PEG de diferente longitud. Para ello se prepararon reacciones de conjugación donde se emplearon oligómeros de PEG de 2000, 6000 y 20 000 Da. La caracterización físico-química de estos nuevos conjugados de mayor peso molecular se comparó con los resultados obtenidos de los estudios anteriores (Figura 24). El análisis termogravimétrico mostró un aumento del componente orgánico presente en las nanopartículas debido al incremento de la longitud de la cadena de PEG (hasta un 60%). Sin embargo esto no significa mayor unión de moléculas de PEG ya que los cálculos indican $\sim 1,5$ y $0,5$ moléculas de $\text{PEG}-(\text{NH}_2)_{2(6000)}$ y $\text{PEG}-(\text{NH}_2)_{2(20000)}$ por nm^2 de superficie. La espectroscopía infrarroja permitió confirmar la presencia del polímero unido a las nanopartículas en estas nuevas muestras. Y finalmente, la evolución del potencial Z en función del pH mostró que el aumento de la longitud de la cadena de los residuos de PEG produce una disminución de la carga neta superficial de las nanopartículas debido a un mayor apantallamiento de las cargas de los grupos carboxilos.

Al aumentar la longitud de la cadena de PEG aumentó la capacidad de reconocimiento del anticuerpo a las nanopartículas modificadas con estos polímeros. El empleo de residuos de PEG de mayor peso molecular (20 000 Da) permite aumentar la sensibilidad de detección con este ensayo hasta concentraciones de $1,27 \text{ ng/mL}$ de nanopartículas. Es posible que esto sea debido a la presencia de cadenas con mayor número de subunidades de óxido de etileno con una mayor flexibilidad y movilidad en la estructura, lo que facilita el reconocimiento por el anticuerpo. Los resultados se observan en la Figura 25. Las muestras preparadas para ELISA fueron previamente analizadas por espectroscopía infrarroja para comprobar la eficiencia de la reacción de conjugación (Figura 25B). Al aumentar la longitud de la cadena de PEG se observó un aumento en la intensidad de las vibración del enlace C-O-C correspondientes al PEG.

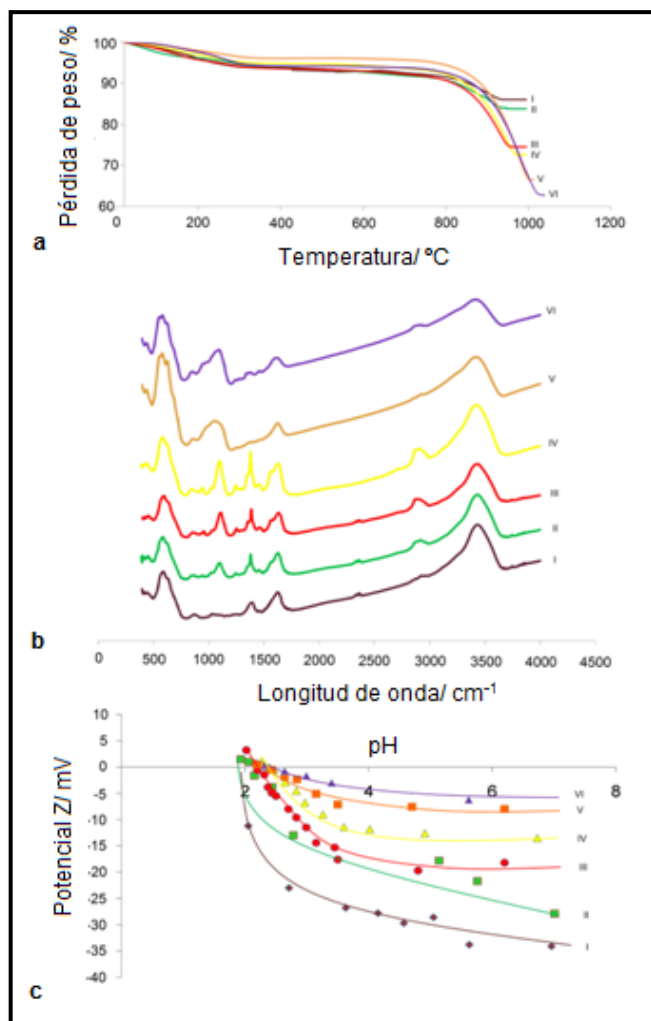


Figura 24. Caracterización físico-química de las NP-DMSA conjugadas a diferentes cadenas de PEG. A) Análisis termogravimétrico de los conjugados. B) Espectro infrarrojo de las diferentes muestras. C) Evolución del potencial Z en función del pH. [I] NP-DMSA, [II] NP-PEG-NH₂ (750 Da), [III] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ (1900 Da), [IV] NP-PEG-(NH₂)₂ (2000 Da), [V] NP-PEG-(NH₂)₂ (6000 Da), [VI] NP-PEG-(NH₂)₂ (20000 Da).

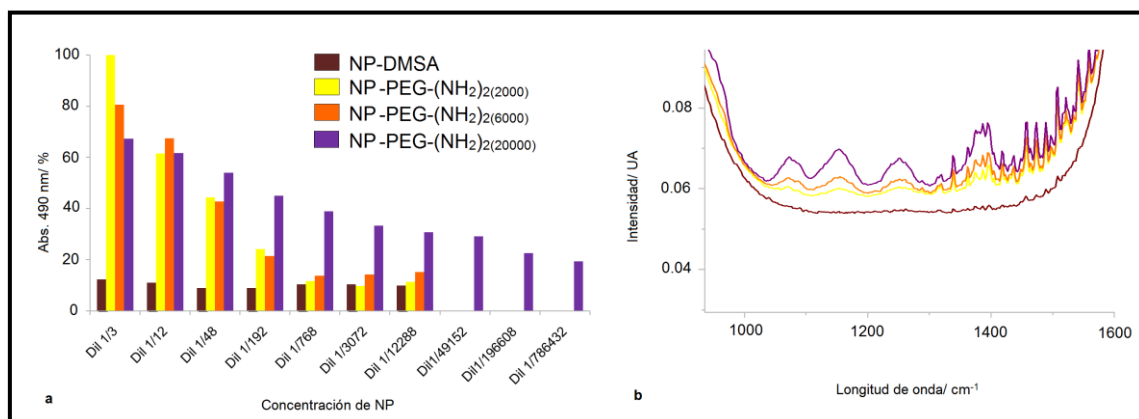


Figura 25. A) Detección de NP conjugadas a PEG de cadena larga mediante ELISA. B) Espectro infrarrojo de NP conjugadas a PEG de cadena larga.

Con el objetivo de estudiar una posible aplicación de este método de detección de nanopartículas conjugadas a PEG durante ensayos clínicos de farmacocinética y biodistribución se estudió la capacidad de detección del anticuerpo PEG02 a nanopartículas en presencia de plasma. Sin embargo en un ensayo donde se analizan muestras *ex vivo*, se requiere estudiar el posible efecto de la formación de la corona de proteínas alrededor de las nanopartículas (Lundqvist et al., 2011) en la capacidad de detección del anticuerpo. Para ello diferentes muestras de NP-PEG-(NH₂)₂ (2000 Da), NP-PEG-(NH₂)₂ (6000 Da), NP-PEG-(NH₂)₂ (20000 Da) fueron incubadas en mezclas de PBS/BSA 0,5% o PBS/BSA 0,5%/plasma 10%, se centrifugaron y se colectó el sobrenadante. Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 26.

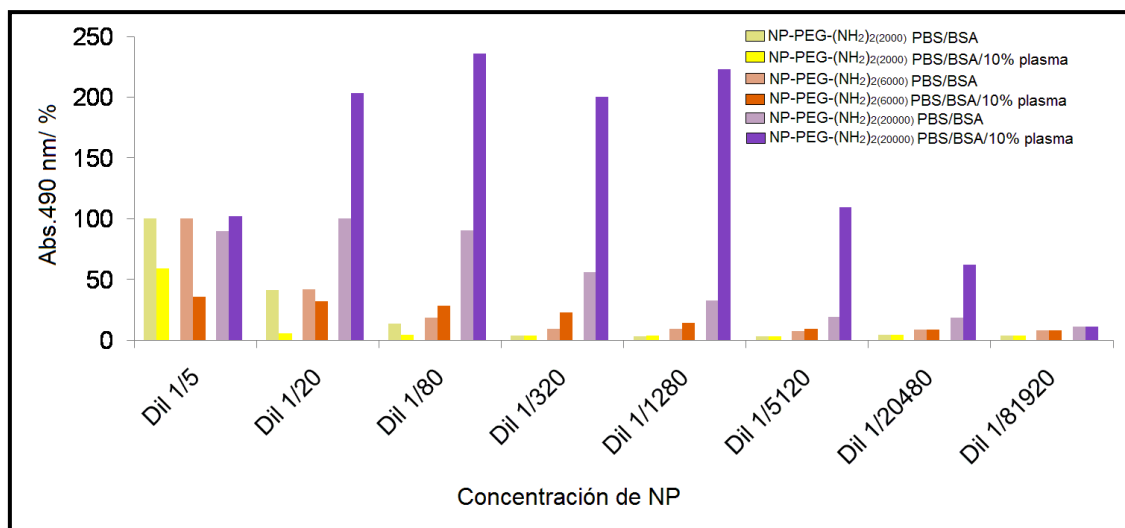


Figura 26. A) Efecto del plasma en la detección de NP conjugadas a PEG de cadena larga.

En el caso de las nanopartículas NP-PEG-(NH₂)₂ (2000 Da), NP-PEG-(NH₂)₂ (6000 Da), precipitan durante la centrifugación y no pueden ser detectadas por el anticuerpo. Es posible que la presencia de sales y proteínas en el medio provoquen una compactación de la doble capa eléctrica que rodea y estabiliza las nanopartículas, con lo cual se favorecen las interacciones magnéticas entre partículas y estas precipitan. Por otra parte las NP-PEG-(NH₂)₂ (20000 Da) parecen mantenerse estables después de la incubación en presencia de plasma y el proceso de centrifugación, probablemente debido a un mayor impedimento estérico que producen las cadenas de PEG de mayor longitud. Aunque los resultados demuestran que existe la posibilidad de utilizar esta técnica para la detección de nanopartículas conjugadas a PEG provenientes de mezclas biológicas, es necesario hacer un estudio más profundo de los parámetros que afectan la sensibilidad del ensayo.

En este caso observamos que existe una sobreestimación de la concentración de las nanopartículas NP-PEG-(NH₂)₂ (20000 Da) que fueron incubadas en presencia de plasma. Para el establecimiento de esta técnica analítica como ensayo de rutina en estudios de detección en muestras biológicas, es necesario hacer modificaciones del protocolo que permitan aliviar el efecto del plasma en la detección, por ejemplo, optimización del tampón, efectos de dilución, influencia de la temperatura durante el proceso de preparación de las muestras, variación del pH o presencia de detergentes en el medio.

Este trabajo ha permitido desarrollar una nueva técnica de caracterización y cuantificación de nanopartículas magnéticas conjugadas a PEG. La sensibilidad de este método es mucho mayor que los ensayos tradicionales de cuantificación de PEG (HPLC o ensayos colorimétricos) y también mucho más seguro que técnicas igual de sensibles como el marcaje con compuestos radiactivos. Este sistema abre nuevas posibilidades en la caracterización de nanopartículas magnéticas conjugadas a PEG y en la posibilidad de su detección en muestras biológicas a muy bajas concentraciones.

4.3. Evaluación de las nanopartículas como agentes de contraste para imagen por Resonancia Magnética Nuclear

La aplicación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como agentes de contraste para imagen por RMN se encuentra ampliamente extendida. En dependencia del radio hidrodinámico y del tipo de recubrimiento superficial que presenten, será su perfil de biodistribución y por ello se pueden clasificar en función del órgano, tejido o región que se quiera visualizar. Al acumularse en determinado tejido las NPs provocan un aumento del contraste en la imagen de RMN debido al acortamiento de los tiempos de relajación longitudinal (T₁) y transversal (T₂) de los protones de las moléculas de agua del tejido. Debido a que ese efecto es mucho más marcado sobre el T₂, las NPM se suelen utilizar generalmente como agentes de contraste negativo (Corot et al., 2006).

Las propiedades relaxométricas de las nanopartículas magnéticas y por tanto su eficiencia como agentes de contraste se ven condicionadas por parámetros como el tamaño, la composición, cristalinidad o las características del recubrimiento superficial (Singh and Sahoo, 2013). Con respecto al tamaño de partícula, se ha sugerido que las propiedades relaxométricas se pueden mejorar, ya sea mediante el aumento del tamaño de partícula o mediante la fabricación de nanoagregados magnéticos que comprenden

pequeñas NPs (Shin et al., 2009). Por otra parte las características del recubrimiento orgánico de las nanopartículas pueden influir en los tiempos de relajación de las moléculas de agua. En este sentido, se ha demostrado el efecto de diferentes recubrimientos en las propiedades relaxométricas de las nanopartículas y se ha sugerido que un recubrimiento de naturaleza hidrofílica y elevada capacidad de solvatación como el PEG contribuye positivamente en el aumento de la eficiencia del agente de contraste (Duan et al., 2008; Wattendorf and Merkle, 2008). El contraste final en las imágenes es un reflejo de estas propiedades y se ha evaluado *in vitro* mediante medidas de relaxividad.

La evaluación de las suspensiones como agentes de contraste se realizó con la ayuda del Dr. Fernando Herranz y el Prof. Jesús Ruiz Cabello (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). Se realizó mediante medidas de los tiempos de relajación T_1 y T_2 y calculando posteriormente los valores de relaxividad (r_1 y r_2) (Figura 27). Los tiempos de relajación de las suspensiones acuosas de las muestras se midieron a diferentes concentraciones de hierro y la pendiente de dicha recta (r) constituye una medida de la eficiencia de los mismos. Se observó una dependencia lineal entre el inverso de los tiempos de relajación y la concentración de hierro para cada muestra, de acuerdo con la ecuación:

$$R_i = R_{bi} + r_i[\text{Fe}]$$

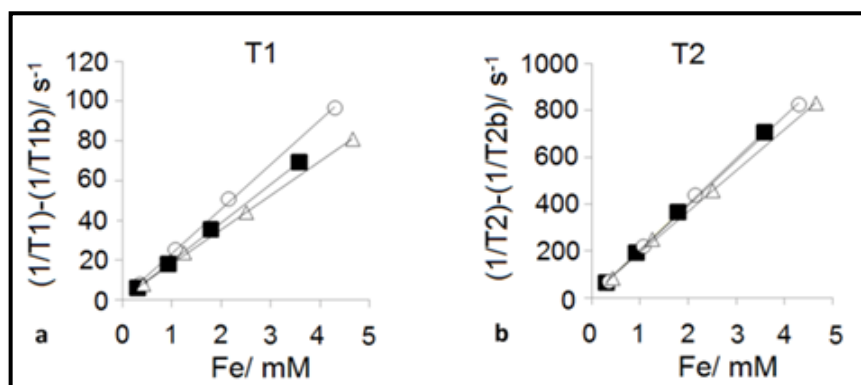


Figura 27. Propiedades relaxométricas de las nanopartículas recubiertas con PEG. ([○] NP-PEG-NH₂, [■] NP-PEG-(NH₂)₂, y [Δ] NP-PEG-Prop-(NH₂)₂).

Los valores de r_1 medidos se encuentran entre 18-22 mM⁻¹s⁻¹ para las diferentes muestras de nanopartículas conjugadas a PEG. Por otra parte los tiempos de relajación transversal (T_2) proporcionaron valores de r_2 entre 175 y 196 mM⁻¹s⁻¹. Los valores de r_1 son similares a los mostrados por los agentes comerciales aprobados para su uso clínico (Wang, 2011). Sin embargo los valores de r_2 , responsables del contraste negativo de las nanopartículas, son mayores que los correspondientes a los diferentes agentes

comerciales y similares a los reportados para otras partículas de óxido de hierro superparamagnéticas sintetizadas por el método de descomposición (Roca et al., 2009; Taboada et al., 2007) (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de las propiedades relaxométricas de diferentes agentes comerciales o partículas modificadas con PEG (Vuong et al., 2012; Wang, 2011) y las NP-PEG preparadas en este trabajo.

| Muestras | D_{TEM} (nm) | D_h (nm) | r_1 (mM⁻¹s⁻¹) | r_2 (mM⁻¹s⁻¹) |
|---|--|--|---|---|
| Sinerem/Combindex | 4-15 | 30 | 10 | 60 |
| Resovist | 4-15 | 45-60 | 25.4 | 151 |
| Endorem/Feridex | 4-15 | 120-180 | 23.9 | 98.3 |
| 4nm-PEG1100 | 4 | - | - | 17,5 |
| 6nm-PEG1100 | 6 | - | - | 42 |
| NP-PEG-NH₂ | 12 | 56 | 22.4 | 191.3 |
| NP-PEG-(NH₂)₂ | 12 | 49 | 19.2 | 195.9 |
| NP-PEG-Prop-(NH₂)₂ | 12 | 52 | 17.9 | 175.3 |

Se puede concluir de estos resultados que para los agentes comerciales como Endorem o Resovist los valores de r_2 elevados están dados por el grado de agregación existente en la suspensión coloidal, mientras que en el caso de las nanopartículas sintetizadas por descomposición estos elevados valores son debido a las mejores propiedades magnéticas de estas partículas y a la elevada cristalinidad del material (Figura 28). Mejorar la eficiencia del agente de contraste al emplear este método de síntesis permitiría durante la aplicación clínica de las nanopartículas reducir la dosis administrada o ganar sensibilidad en la técnica de imagen.

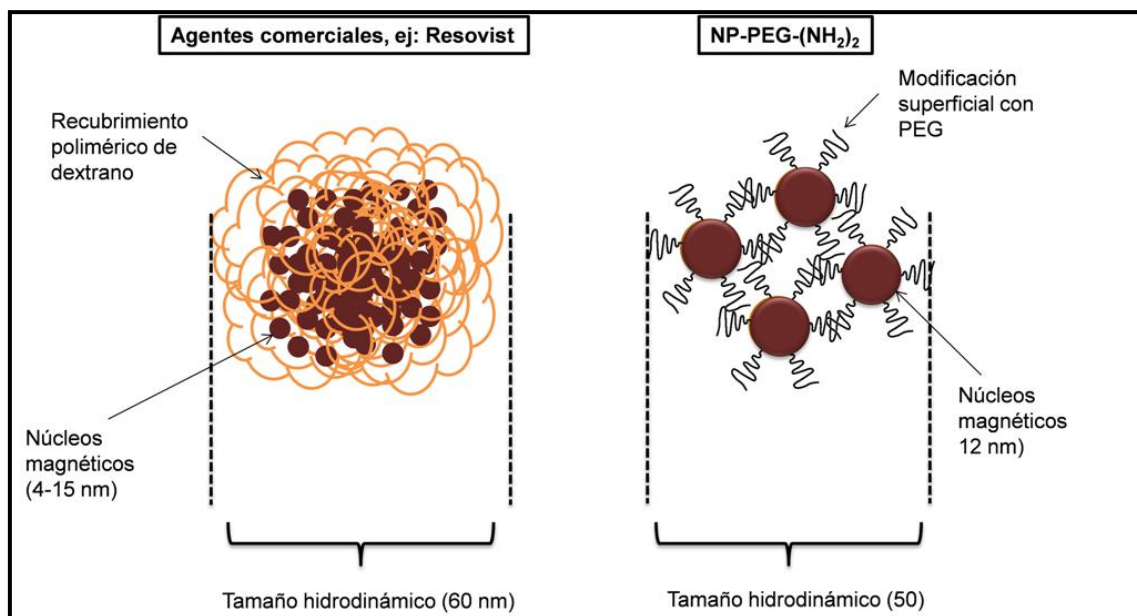


Figura 28. Representación esquemática de las propiedades coloidales de agentes comerciales (Resovist) y la formulación de NP-PEG-(NH₂)₂.

4.4. Conjugación de las nanopartículas a dos péptidos bioactivos

El éxito de las terapias basadas en péptidos ha sido menor que el esperado a pesar de sus enormes posibilidades terapéuticas y a su disponibilidad gracias a la industria biotecnológica. La causa fundamental de esta situación es su inadecuada farmacocinética, baja biodisponibilidad, y baja especificidad por el sitio de acción. Afortunadamente la Nanomedicina y en particular el desarrollo de los sistemas de liberación controlada de fármacos intentan revertir esta situación (Zhang et al., 2012). Se han descrito numerosos sistemas de liberación modificada de péptidos: hidrogeles, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas, etc (Mulder et al., 2013). El uso de nanopartículas magnéticas constituye una alternativa muy prometedora como sistema de liberación de este tipo de biomoléculas (Hansen et al., 2013; Scarberry et al., 2008) por su ventaja de poder concentrar las partículas con un imán externo sobre la zona a tratar. Varios problemas que hay solucionar primero son: Garantizar una unión fuerte y estable del péptido a las partículas para no perderlo en el torrente sanguíneo, pero permitir su liberación en el sitio diana sin alterar su actividad biológica. Trabajos previos del grupo con la citoquina interferón γ han mostrado que la inmovilización electrostática es una buena estrategia a seguir (Mejias et al., 2008).

En este trabajo se ha evaluado la estrategia de unión no covalente a dos péptidos bioactivos: CIGB-300 y CIGB-500. El CIGB-300 es una molécula de naturaleza peptídica que inhibe el evento de fosforilación catalizado por la enzima Caseína Quinasa 2 (CK2) a través de la interacción directa con el sitio fosfoceptor en el sustrato (Perea et al., 2004). Estudios previos han demostrado la capacidad de este péptido para inhibir la proliferación celular y retardar el crecimiento tumoral en modelos animales de cáncer (Perea et al., 2008). El péptido CIGB-300 (GRKKRRQRRRPPQ-A-CWMSPRHLGTC, pI=12,3, calculado con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy), fue obtenido con una pureza superior al 98% en la unidad de Síntesis Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana) mediante un procedimiento de síntesis en fase sólida y purificación en cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución.

Por otra parte el CIGB-500 o GHRP6 (HWAWFK, pI=9,5 calculado con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy) es un péptido sintético de seis aminoácidos que es miembro de la familia de agentes secretagogos de la Hormona de Crecimiento (GH) (Bowers, 1998). Se ha observado que la administración del péptido CIGB-500 en modelos animales de fibrosis hepática reduce significativamente la progresión de la enfermedad actuando como un agente hepatoprotector (Berlanga-Acosta et al., 2012). El péptido CIGB-500 fue obtenido con una pureza superior al 98% en los laboratorios Lipotec SA (Barcelona, España) y en todo momento su manipulación se realizó protegido de la luz.

En este trabajo se estudió una estrategia de funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con DMSA o conjugadas a PEG con los péptidos CIGB-300 y CIGB-500. Teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de ambos péptidos (CIGB-300 (12,3) y CIGB-500 (9,5)) a pH fisiológico ambas biomoléculas presentan carga neta positiva. Por este motivo se justifica utilizar nanopartículas cargadas negativamente en su superficie para poder adsorber dichos péptidos mediante una interacción electrostática. Existen numerosos estudios que indican que las nanopartículas pueden adsorber de forma espontánea distintos tipos de moléculas cargadas (Kingsley et al., 2006; Nitin et al., 2004). Para establecer las condiciones de unión iniciales se estudiaron tres concentraciones de nanopartículas en el medio de interacción (300, 600 y 900 $\mu\text{g/mL}$) que contenía 40 μg de péptido y se incubaron durante dos horas en agitación orbital a 4°C. Las nanopartículas se separaron mediante el uso de imanes (0.2 T) y se recogió el sobrenadante para su análisis (péptido no unido (fracción S)). Las nanopartículas se resuspendieron en agua, se lavaron durante 30 minutos en agitación, y se separaron mediante imanes para obtener nuevos sobrenadantes (péptido liberado durante el lavado (fracción L)). El esquema de trabajo se muestra en la Figura 29. Para determinar la influencia de factores (fuerza iónica o presencia de detergentes) que pueden afectar la interacción entre los péptidos y las

nanopartículas, los conjugados se resuspendieron en diferentes medios de liberación. Se incubaron en PBS 1x o SDS 0,1%, se separaron mediante imanes y se recogieron los sobrenadantes (fracción L) para analizarlos junto con los anteriores.

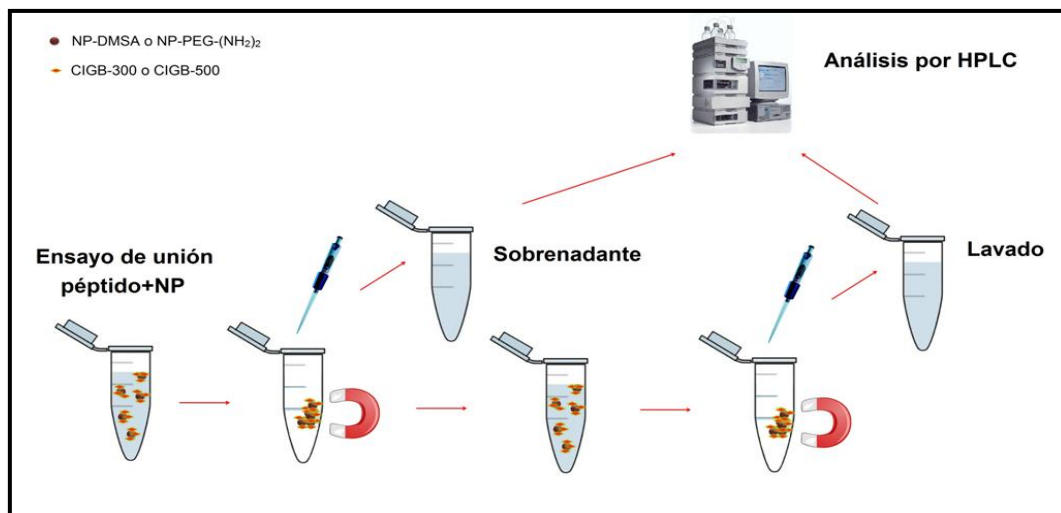


Figura 29. Esquema general de trabajo en los ensayos de unión péptido-nanopartículas.

La cuantificación de los péptidos en las fracciones S y L se realizó empleando el método analítico de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) con una columna XB-C18 con la ayuda del Dr. Marco Filice (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC). En la Figura 30 se observan los cromatogramas obtenidos para estas dos especies. Para ambos péptidos se realizó una recta patrón que permitió la cuantificación del péptido libre después de los diferentes ensayos de unión.

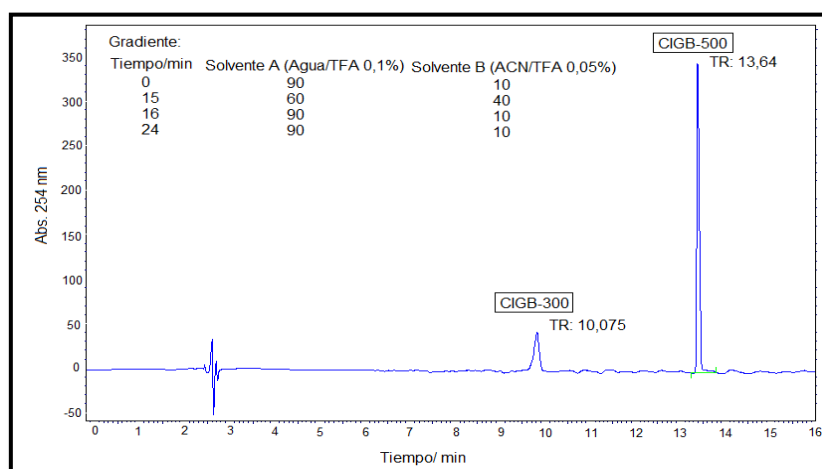


Figura 30. Cromatogramas obtenidos empleando HPLC-RP para una mezcla (1:1) de 40 µg de péptidos.

Al estudiar concentraciones crecientes de nanopartículas en el medio de interacción (300, 600 y 900 $\mu\text{g/mL}$) frente a una concentración fija de péptido (40 $\mu\text{g/mL}$ en cada caso) no se detectó péptido libre en las fracciones correspondientes al sobrenadante y al lavado de las muestras. Partiendo de este resultado se fijó la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas para los estudios posteriores.

Con el objetivo de determinar el grado de saturación de las nanopartículas y por tanto su capacidad de carga, se estudió la unión de los péptidos a las nanopartículas fijando una concentración de nanopartícula de 300 $\mu\text{g/mL}$ y se añadieron concentraciones de péptido crecientes (40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31. Como se puede observar ambos péptidos en la condición inicial (300 $\mu\text{g/mL}$ NP: 40 $\mu\text{g/mL}$ péptido) se unen a las nanopartículas y esta unión permanece estable después del lavado. Al aumentar la cantidad de péptido en el medio se observa cómo en ambos casos ocurre la saturación en la capacidad de carga de ambos tipos de nanopartículas. Sin embargo, en este proceso influye tanto la carga neta superficial de las nanopartículas (NP-DMSA, -40 mV; NP-PEG-(NH₂)₂, -15 mV), como la carga neta de cada péptido relacionada con su punto isoeléctrico (CIGB-300 pI=12,3; CIGB-500 pI=9,5).

Las NP-DMSA al presentar una carga superficial mucho más negativa, son capaces de unir mayor cantidad de péptido y la adsorción resulta más estable después del proceso de lavado. La conjugación del PEG a los grupos carboxilos del DMSA disminuye el número de grupos carboxilos disponibles, además del impedimento estérico de las cadenas del polímero. Por otra parte la molécula del CIGB-300 mostró una capacidad de adsorción mayor a la superficie de las nanopartículas, así como una interacción más fuerte y estable que el CIGB-500. Esto puede ser debido a la presencia de varias lisinas y argininas en su estructura que aportan cargas positivas favorables en el proceso de interacción con las cargas negativas de las nanopartículas.

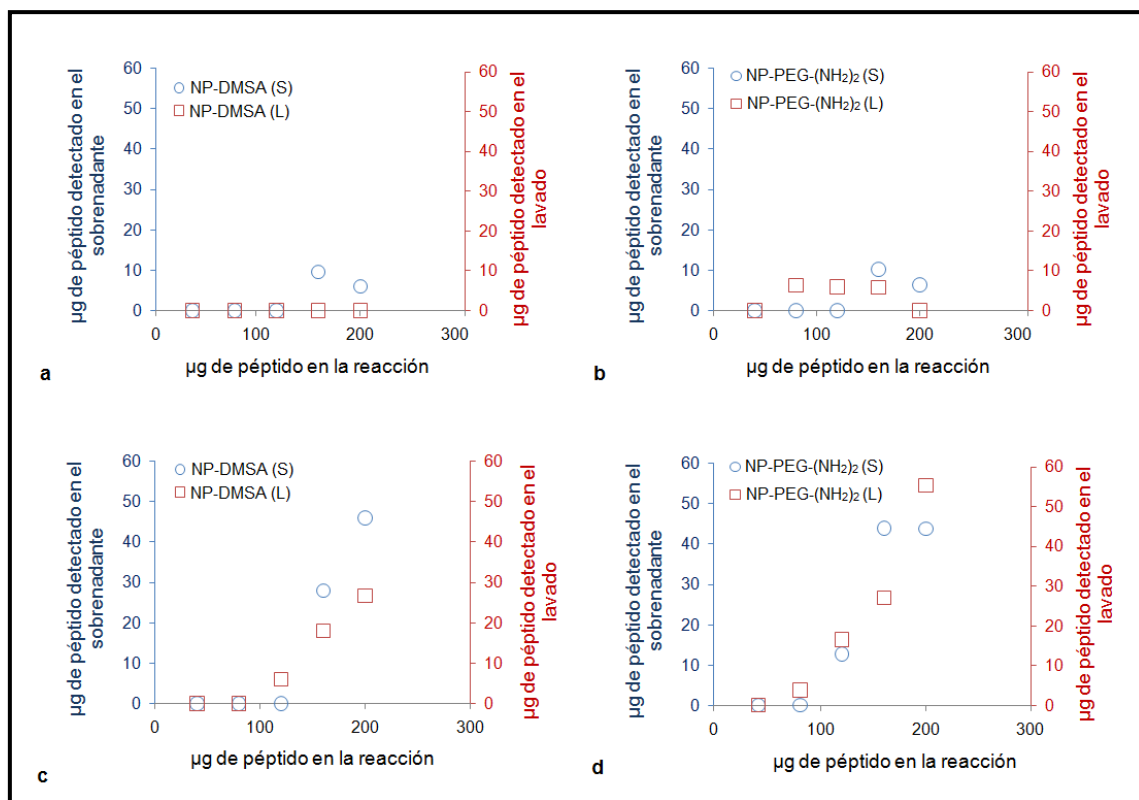


Figura 31. Cuantificación del péptido libre en las fracciones del sobrenadante y lavado de los distintos ensayos de unión a las nanopartículas modificadas con DMSA y PEG. A-B) CIGB-300. C-D) CIGB-500.

Debido a que la interacción entre las nanopartículas y los péptidos se basa en interacciones electrostáticas, la fuerza iónica del medio es uno de los parámetros que más pueden afectar la adsorción, ya que los iones del medio se estructuran alrededor de los grupos cargados de los péptidos y de la superficie de las nanopartículas, dificultando esta interacción. Para analizar el efecto de la fuerza iónica el proceso de unión se llevó a cabo en presencia de PBS 1X y los lavados también se realizaron con este tampón. También se estudió la influencia de detergentes en el medio como posible agente desestabilizador de la formulación. En ambos casos se observó que el aumento de la fuerza iónica del medio, así como la presencia de detergentes no afectó la unión de los péptidos a las nanopartículas y sólo en el caso de la etapa de lavado del CIGB 500 se observó la desorción de ~10% del péptido unido a las nanopartículas (Figura 32).

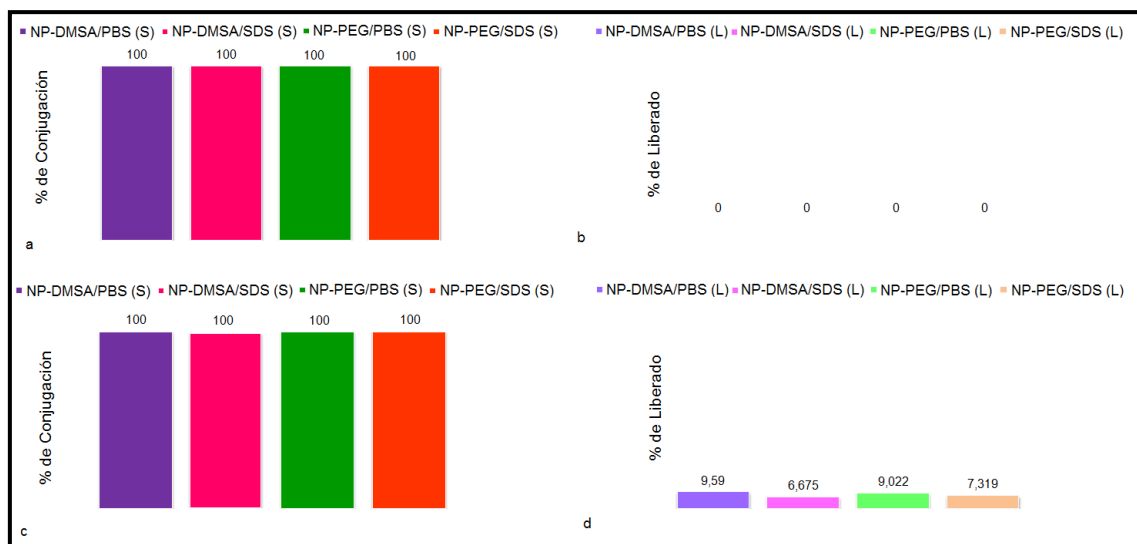


Figura 32. Cuantificación del péptido libre en las fracciones del sobrenadante y lavado de los distintos ensayos de unión a las nanopartículas modificadas con DMSA y PEG en presencia de PBS y SDS. A-B) CIGB-300. C-D) CIGB-500.

Este resultado permite utilizar las nanopartículas como vehículos de administración de los péptidos CIGB 300 y CIGB 500 tanto en cultivo celular como en modelos animales, ya que no se produce la pérdida de los mismos en medios de alta fuerza iónica a pH fisiológico. Teniendo en cuenta que existen numerosos aspectos que determinan la biodistribución y toxicidad de las nanopartículas *in vivo*, así como la captación de las nanopartículas por los distintos tipos celulares, su internalización, localización intracelular y mantenimiento de la actividad biológica, se recomienda continuar estos estudios en ensayos *in vitro* e *in vivo*. El siguiente paso será el estudio de las mejores condiciones de liberación y estudiar la actividad biológica de los péptidos una vez liberados. En algún caso se ha observado que la liberación no es necesaria, como en el caso de la citoquina interferón- γ que era activa también unida a las nanopartículas recubiertas de DMSA (Mejias et al., 2008; Mejias et al., 2011).

Capítulo 5. Toxicidad

- 5.1 *Efectos citotóxicos de las nanopartículas recubiertas con DMSA o modificadas con PEG*
- 5.2 *Interacción célula-nanopartícula*
- 5.3 *Viabilidad celular*
- 5.4 *Hematotoxicidad*

Capítulo 5. Toxicidad

Una de las herramientas más empleadas para el estudio de la toxicidad asociada a tratamientos basados en nanopartículas, antes de su aplicación *in vivo* son los cultivos celulares. Estos poseen una serie de ventajas con respecto a los estudios *in vivo*: menor complejidad, costes y cuestiones éticas. Por otra parte presentan un mayor control sobre el ambiente que rodea a las células y homogeneidad tanto a nivel morfológico como de composición, permitiendo profundizar más fácilmente en la comprensión de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar durante los tratamientos (Lewinski et al., 2008; Mahmoudi et al., 2010). Saber cómo las nanopartículas interactúan con las células y el microambiente que las rodea permitirá determinar en una aproximación inicial la seguridad del producto en una aplicación clínica a largo plazo (Markides et al., 2012).

Para las nanopartículas en general se han descrito varios mecanismos de entrada a la célula, sin embargo la forma más estudiada es la vía de endocitosis. Aunque existen diferencias sobre el concepto de endocitosis, se podría decir que es el proceso por el que las células son capaces de incorporar en su interior moléculas de distintos tamaños, que engloban en una invaginación de su membrana plasmática, que acaba desprendiéndose de la misma, quedando las moléculas contenidas en el interior de una vesícula en el citoplasma (Bareford and Swaan, 2007). Esta vesícula sigue distintas rutas una vez dentro de la célula dependiendo del mecanismo endocítico, pudiendo dirigirse bien hacia la ruta degradativa de los lisosomas, o bien puede evitarla y dirigirse al aparato de Golgi, al retículo endoplasmático e incluso al núcleo. La endocitosis comprende dos tipos de mecanismos diferentes, fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis: está implicada en la internalización de grandes partículas (más de 200 nm), así como de bacterias y otros microorganismos. La pinocitosis está implicada en la entrada de fluidos y solutos en la célula. Dentro de esta vía existen distintas variantes, que se pueden dividir en dos categorías, independientes de receptor: macropinocitosis; y dependientes de receptor: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolinas o endocitosis independiente de ambas (Figura 33). Como se grafica en la Figura 33 entre ellas se diferencian, entre otras cosas, por el tamaño de vesícula endocítica que forman (Verma and Stellacci, 2010). La internalización de partículas grandes se ve favorecida a través de procesos de fagocitosis. La internalización no específica de partículas de $\sim 1\mu\text{m}$ tiene lugar a través de mecanismos de pinocitosis y partículas $<100\text{ nm}$ entran a la célula vía endocitosis mediada por clatrin o caveolinas (Petros and DeSimone, 2010).

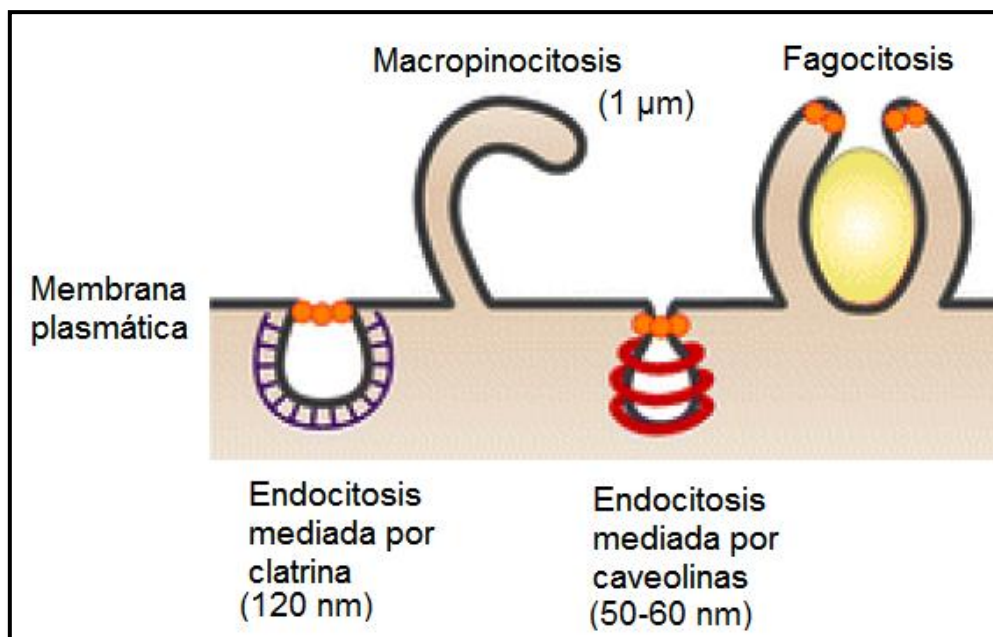


Figura 33. Esquema de los principales mecanismos endocíticos. (Adaptado de (Mercer et al., 2010)).

La influencia del mecanismo de entrada de la nanopartícula en la célula sobre la citotoxicidad es de gran importancia. Un ejemplo de esto es el caso de nanopartículas de plata, para las cuales se ha descrito, además de la vía endocítica una forma de entrada a través de un proceso de difusión por la membrana plasmática formando poros. Estas partículas resultan tóxicas para la célula ya que no sólo son capaces de perforar la membrana plasmática sino que traspasan la membrana nuclear y producen daño genotóxico en la célula (AshaRani et al., 2009). También el recubrimiento es crítico para entender la internalización celular de las NPM. Por ejemplo, nanopartículas modificadas con glucosa o por PEG son internalizadas por endocitosis mediada por caveolinas o por endocitosis mediada por clatrina, respectivamente (Moros et al., 2012).

Los efectos citotóxicos de un tratamiento basado en nanopartículas pueden ser de dos tipos de forma general: los que son independientes de la interacción célula-nanopartícula o aquellos asociados al proceso de internalización y transformación intracelular de las nanopartículas. En el primer caso este tipo de citotoxicidad se debe a la interacción de las nanopartículas con el medio de cultivo. Debido a la reactividad superficial de las nanopartículas estas tienden a formar una “corona de proteínas” que secuestra proteínas, nutrientes y factores de crecimiento presentes en el medio en mayor o menor medida y puede afectar la viabilidad celular (Lundqvist et al., 2011). También la adición de partículas al medio de cultivo puede modificar el pH o la presión osmótica y provocar indirectamente la muerte celular. Para evitar confundir estos posibles resultados de citotoxicidad no asociada a la interacción célula-nanopartícula se

recomienda incluir en el protocolo de trabajo la incubación previa de las nanopartículas, su decantación y resuspensión en medio de cultivo fresco (Laurent et al., 2012). Por otra parte se recomienda también realizar estudios de citotoxicidad empleando inhibidores del proceso de endocitosis o con tipos celulares con muy baja capacidad endocítica (ej. Eritrocitos) para confirmar que los resultados observados se deben a un fenómeno de toxicidad indirecta provocada por las nanopartículas en el medio de cultivo (Soenen and Cuyper, 2009). En este trabajo se siguieron ambas recomendaciones.

Los efectos citotóxicos asociados al proceso de internalización en una primera etapa se suele estudiar mediante diferentes técnicas de microscopía (TEM, óptica) para ver si existe o no un proceso de internalización de las nanopartículas. En el caso de nanopartículas que sólo se adhieren a la membrana citoplasmática pero no son internalizadas, resulta más probable que estas se desprendan durante los procesos de división celular o migración debido a fuerzas de cizalla (Soenen and Cuyper, 2009) y no provoquen afectaciones de la viabilidad celular (Ruiz et al., 2013b). La microscopía electrónica de transmisión ha permitido describir el proceso de endocitosis, ubicación subcelular y degradación de nanopartículas magnéticas con recubrimientos aniónicos (Lartigue et al., 2013). Las nanopartículas son internalizadas por la célula vía endocitosis y quedan agregadas inicialmente en endosomas tempranos. Posteriormente estos endosomas se fusionan con heterolisosomas y poco a poco ocurre un proceso de dispersión de las nanopartículas y comienza su degradación. La co-localización de las nanopartículas con estructuras lisosomales dispersas en el citoplasma también ha sido verificada por microscopía óptica y el empleo de la sonda fluorescente LysoTracker Red DND-99 (Mejias et al., 2011; Villanueva et al., 2009). La tinción con azul de Prusia específica de hierro también permite localizar las nanopartículas en el citoplasma de las células o adheridas a la membrana citoplasmática. De forma general se emplea también una contratinción con rojo neutro para estudiar posibles cambios en la morfología de la célula (Calero et al., 2013; Villanueva et al., 2009).

Existen numerosos métodos para estudiar la citotoxicidad celular asociada a la interacción célula-nanopartícula (Figura 34).

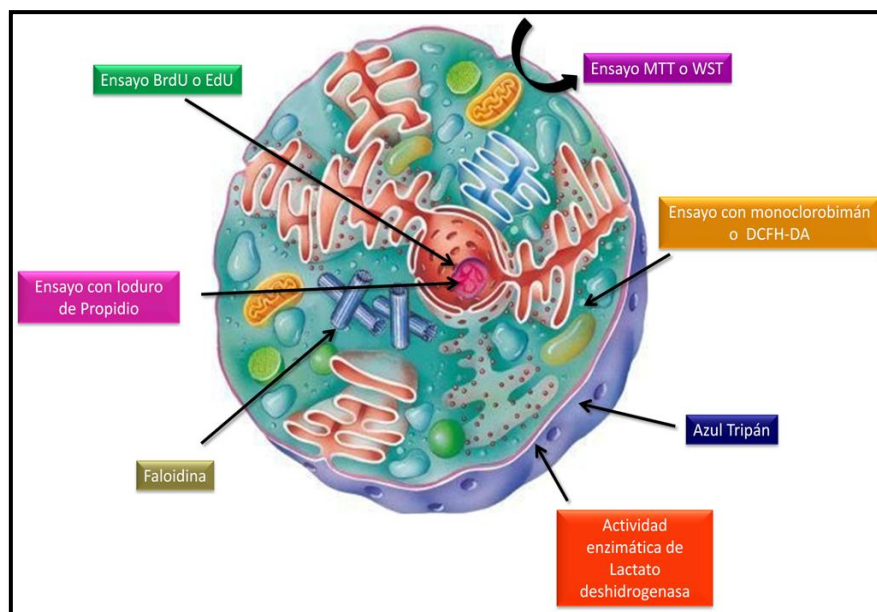


Figura 34. Métodos más usados para describir posibles afectaciones de la viabilidad celular asociada a una interacción célula-nanopartícula.

Es necesario señalar que para un análisis riguroso del fenómeno de citotoxicidad se requiere la combinación de varios de estos métodos ya que cada uno aporta información diferente por ejemplo: integridad de la membrana celular (Azul Tripán, Actividad enzimática de Lactato deshidrogenasa) integridad de la membrana lisosomal (Rojo neutro), ausencia de daños en el DNA (tinción con ioduro de propidio), integridad mitocondrial (MTT), estrés oxidativo y generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Ensayo con monoclobimán para detectar niveles de GSH o de cuantificación de ROS con DCFH-DA), proliferación celular (MTT, BrdU, EdU), arquitectura del citoesqueleto (tinción inmunohistoquímica para α -tubulina o Vinculina, y para F-actina con Faloidina marcada con rodamina), entre otros (Laurent et al., 2012; Soenen and Cuyper, 2009).

En este trabajo se han empleado varios de estos métodos con el fin de reunir suficiente información sobre la toxicidad asociada a las nanopartículas recubiertas con DMSA y modificadas con PEG. Se ha empleado la tinción con Azul de Prusia para identificar las nanopartículas con una contratinción con rojo neutro para observar posibles daños en la morfología de la célula. Se han observado las células *in vivo* empleando un microscopio óptico invertido. Para estudiar la proliferación celular y afectaciones en la viabilidad se empleó el método del MTT y se comparó con los resultados obtenidos en un contador en tiempo real xCELLigence RTCA-DP. La localización intracelular de las nanopartículas se realizó empleando la sonda fluorescente LysoTracker Red DND-99. Se ha estudiado la interacción de las nanopartículas con diferentes líneas

celulares, tumorales y no-tumorales, así como con diferente capacidad endocítica y actividad metabólica. Y finalmente se ha estudiado la toxicidad de las nanopartículas frente a las células de la sangre así como su genotoxicidad empleando el ensayo de Cometa.

5.1. Efectos citotóxicos de las nanopartículas recubiertas con DMSA o modificadas con PEG

De forma general se puede decir que las nanopartículas recubiertas con DMSA o modificadas con PEG no afectan la viabilidad celular. Sin embargo, muchos resultados aparentemente diferentes han sido descritos por diferentes grupos de investigación. Esto es debido a la elevada variabilidad experimental en la selección de las condiciones de trabajo: tipos de células ensayadas, variabilidad en la forma de preparar las nanopartículas y las concentraciones utilizadas, y por último diferencias en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas empleadas (Laurent et al., 2012). Se hace necesario intentar resumir toda esta información para llegar a conclusiones más precisas.

En la Tabla 7 se resumen los datos más importantes sobre la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con DMSA o modificadas con PEG. En esta tabla sólo se presentan los datos correspondientes a los ensayos de determinación directa de la viabilidad celular. Sin embargo, la información toxicológica de estas nanopartículas *in vitro* es mucho más amplia y comprende el estudio de otros parámetros como: : estrés oxidativo (Calero et al., 2013; Ge et al., 2013; Hohnholt and Dringen, 2011; Mejías et al., 2013), reacciones inflamatorias (Liu et al., 2011; Mejias et al., 2011; Wilhelm and Gazeau, 2008), cambios en la morfología (Auffan et al., 2006; Calero et al., 2013; da Paz et al., 2012; Ge et al., 2013; Ge et al., 2009; Geppert et al., 2011; Hohnholt and Dringen, 2011; Luengo et al., 2013; Mejias et al., 2011; Mejías et al., 2010; Qin et al., 2013; Ruiz et al., 2013b; Wilhelm and Gazeau, 2008), adhesión celular (Ge et al., 2013; Liu et al., 2011; Wilhelm and Gazeau, 2008), daños en membrana (Geppert et al., 2011; Hohnholt and Dringen, 2011; Luengo et al., 2013), genotoxicidad (Auffan et al., 2006; Liu et al., 2011), ciclo celular (Calero et al., 2013; Luengo et al., 2013; Mejías et al., 2013; Qin et al., 2013) y procesos de apoptosis (Ge et al., 2013; Luengo et al., 2013; Mejías et al., 2013; Mejias et al., 2011; Qin et al., 2013).

Tabla 7. Resumen de la viabilidad celular en presencia de nanopartículas recubiertas con DMSA o modificadas con PEG.

| Tipo celular | Tamaño Hidrodinámico | Concentración | Tiempo de incubación | Ensayo | Resultado |
|---|-------------------------|---|-------------------------|---|--|
| Fibroblastos humanos normales (Auffan et al., 2006) | 450 ± 20 nm | 10 ⁻⁶ a 10 ⁻¹ g/L | 2, 24, y 48h | WST | Bajo efecto citotóxico (Viabilidad: 100-80%). |
| Fibroblastos humanos normales (Gupta and Gupta, 2005) | 50 nm | 0–1000 µg/mL | 24h | MTT | Viabilidad dependiente de la dosis. |
| Fibroblastos gingivales humanos, células del músculo liso vascular, células progenitoras endoteliales, células tumorales hepáticas, células precursoras miogénicas, linfocitos OT-1 (Wilhelm and Gazeau, 2008) | 30 nm | 0,05 a 20 mM | 10 min a 8 h | La biocompatibilidad de las nanopartículas magnéticas se verificó teniendo en cuenta métodos específicos para cada tipo celular | No se observaron afectaciones en la viabilidad celular y la capacidad de proliferación <i>in vitro</i> . |
| Carcinoma oral escamoso (Ge et al., 2009) | 88.49 ± 18,54nm | 0-640 µg/mL | 12 h | MTT | Viabilidad dependiente de la dosis. Máxima afectación: 70% del control. |
| Macrófagos murinos RAW264.7 (Hou et al., 2010) | - | 0-100 µg/mL | 24 h | MTT | No se observaron afectaciones significativas (p >0.05) a diferentes dosis. |
| Macrófagos murinos | - | 20, 30, 40, 50 y 100 µg/mL | 4, 24 y 48 h | MTT | No se observaron |

| | | | | | |
|--|------------------|--------------------------|--------------|-------------------|---|
| RAW264.7 (Liu et al., 2011) | | | | | afectaciones significativas ($p > 0.05$) a diferentes dosis o en los tiempos de incubación ensayados. |
| Macrófagos murinos RAW264.7, células de cáncer de mama BT-20 (Zhang et al., 2002) | - | 0,2 mg/mL | Hasta 5 días | Azul Tripán | No se afectó la viabilidad celular (valores similares al control). |
| HeLa (Mejías et al., 2010) | 30, 65 y 70 nm | 0,05; 0,1 y 0,5 mg Fe/mL | 1-24 h | MTT | No se observaron afectación después de 24 h de tratamiento (90-100% viabilidad comparada con el control). |
| HeLa (Xiong et al., 2012) | 154,6 \pm 28,3 | 0-600 μ g/mL | 24 h | MTT | No se observaron afectaciones en la viabilidad a diferentes dosis. (80% respecto al control). |
| HeLa (Ruiz et al., 2013b) | 22 y 42 nm | 0,3 mg Fe/mL | 24 h | MTT | No se observaron afectaciones significativas ($p > 0.05$) (93.5 \pm 2.90% respecto al control). |
| HeLa (Calero et al., 2013) | 110 nm | 0,05; 0,1 y 0,5 mg/mL | 24 ó 72 h | MTT y Azul Tripán | No se observaron afectaciones en |

| | | | | | |
|---|---------|---|-------------------|---|--|
| | | | | | las condiciones ensayadas. |
| HeLa, células de osteosarcoma MG-63 | - | 0,02 mg/mL | 1, 2 y 4 h | Azul tripán | No se observaron afectaciones en la viabilidad celular. |
| Cultivos primarios de astrocitos (Geppert et al., 2011) | 60 nm | 100-4000 μ M | 4 h | Actividad enzimática de LDH | No se observaron afectaciones en las condiciones ensayadas. |
| Células oligodendrogiales OLN-93 (Hohnholt and Dringen, 2011) | 60 nm | 0; 0,25; 1 y 4 mM | 8 h | Actividad enzimática de LDH e incubación con ioduro de propidio | La viabilidad celular no se vio comprometida en las condiciones estudiadas. |
| Adenocarcinoma Pan02 murina (Mejias et al., 2011) | ~100 nm | - | 24 h | MTT y Alamar Blue | Relativamente baja citotoxicidad ($96.72 \pm 2.53\%$ del control). |
| MA104 y HepG2 (Chen et al., 2012) | 51 nm | 20-260 μ g/mL | 24 h | WST | > 90% a las diferentes concentraciones de hierro estudiadas. |
| Células de cáncer de colon LS174T and HCT116 (da Paz et al., 2012) | 190 nm | 0,1; 1; 5; 10; 30; 60; 80 y 100 ng/ μ L | 5, 12, 24, o 48 h | MTT | La viabilidad celular de HCT116 disminuyó frente a dosis entre 60 y 80 ng/ μ L. LS174T se vio afectada después de 48 h en concentraciones entre 30 y 80 ng/ μ L. |
| Fibroblastos L929 | 49 nm | 0,25; 0,10 y | 24 h | Live/Dead® kit | Cultivos |

| | | | | | |
|---|----------|--|-------------------|---------------------------|---|
| y osteoblastos Saos-2 (Luengo et al., 2013) | | 0,05 mg de Fe/mL | | | altamente viables después de 1, 4 y 7 días. |
| NCTC 1469 hepáticas murinas (Mejías et al., 2013) | ~65 nm | 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 y 0,5 mg/mL | 24, 48 y 72 h | Alamar Blue | Las nanopartículas no afectaron la proliferación celular. |
| Células madres derivadas de adipocitos (Qin et al., 2013) | 20-40 nm | 12,5; 25, y 50 µg/mL | 24 h | Kit-8 para conteo celular | No hubo afectaciones de la viabilidad comparadas con el control. |
| Células endoteliales aórticas humanas (HAECs) (Ge et al., 2013) | | 0,001 a 0,2 mg/mL | 4, 24, 48, y 72 h | MTT | Afectación de la viabilidad dependiente de la dosis. No se observaron daños hasta 0.02 mg/mL. |

5.2. Interacción célula-nanopartículas

En colaboración con el grupo de la Dra. Angeles Villanueva (Universidad Autónoma de Madrid) y del Dr. Ricardo Bentes de Azevedo (Universidad de Brasilia) se llevaron a cabo los trabajos de evaluación de la toxicidad asociada al tratamiento con nanopartículas mediante diferentes técnicas. Para evaluar la captación de las nanopartículas, se incubaron diferentes líneas celulares (células de adenocarcinoma de páncreas Pan02, de carcinoma cérvico uterino HeLa y de carcinoma hepatocelular HepG2), con diferentes concentraciones de nanopartículas recubiertas de DMSA o conjugadas a PEG diaminado de 2000 Da, y se analizó la presencia de nanopartículas en el cultivo mediante microscopía de campo claro. Estas líneas se seleccionaron con el objetivo de establecer comparaciones entre los distintos tipos celulares y obtener una idea más amplia de la viabilidad celular en presencia de las nanopartículas.

Las células HeLa son una línea perfectamente establecida y caracterizada y constituye el modelo *in vitro* más utilizado en biología celular. Por otra parte el uso de la línea Pan02 permitirá observar el proceso de interacción celular en una línea con una

elevada actividad metabólica, muestra de ello es la abundante presencia de vesículas lisosomales presentes en el citoplasma. Por último la línea HepG2 permitirá obtener una aproximación *in vitro* a la posible toxicidad hepática de estas nanopartículas, las cuales se ha observado que en su biodistribución *in vivo* se acumulan fundamentalmente en el hígado (Ruiz et al., 2013a).

Tras 24 horas de incubación a 0,3 mg/mL y realizar 3 lavados con PBS, se observó que las células habían internalizado parte de las nanopartículas, y estas presentaban un patrón de distribución perinuclear (Figura 35). Observar las células *in vivo* evita posibles artefactos debidos al proceso de fijación o de la tinción celular. También se observó que ambos tipos de células internalizaban mucho más las nanopartículas recubiertas con DMSA, que aquellas modificadas con PEG que permanecían adheridas a la membrana celular (Ruiz et al., 2013b). Además, las Pan02 presentaban mayor cantidad de nanopartículas en el citoplasma que las HeLa.

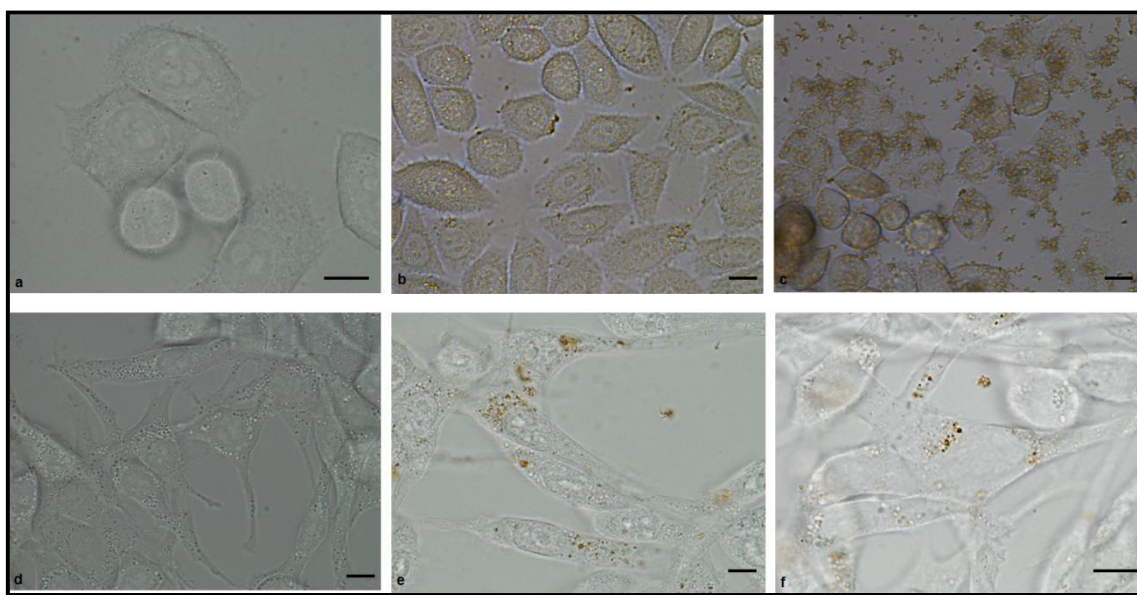


Figura 35. Internalización de las nanopartículas en células HeLa (A: control, B: NP-DMSA, C: NP-PEG-(NH₂)₂) y Pan02 (D: control, E: NP-DMSA, F: NP-PEG-(NH₂)₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 μ m.

Se ha observado que la internalización de las nanopartículas es un fenómeno que depende de la naturaleza del recubrimiento de las mismas, la concentración de nanopartículas y el tiempo de incubación (Villanueva et al., 2009). Por tanto este proceso se ve favorecido en el caso de las nanopartículas recubiertas con DMSA, mientras que las modificadas con PEG de menor carga superficial se mantienen en la superficie celular.

Estas observaciones fueron confirmadas al realizar una tinción con azul de Prusia, específica para detectar hierro (Figura 36).

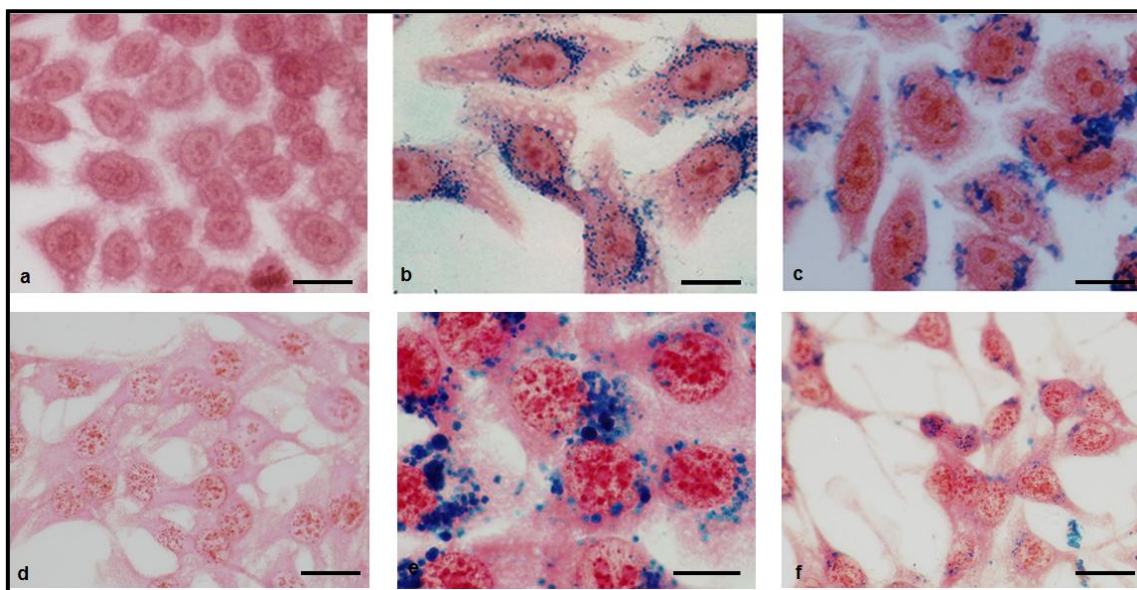


Figura 36. Tinción con azul de Prusia de las células HeLa (A: control, B: NP-DMSA, C: NP-PEG-(NH₂)₂) y Pan02 (D: control, E: NP-DMSA, F: NP-PEG-(NH₂)₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 µm.

Las nanopartículas cargadas en su superficie pueden interaccionar con estructuras de la superficie de la membrana plasmática y ser endocitadas (Nel et al., 2009). Diferentes estudios han descrito el proceso de endocitosis de las nanopartículas recubiertas con DMSA. Este proceso cuenta de dos etapas fundamentales, la adsorción de las nanopartículas a la membrana y posteriormente la etapa de internalización (Wilhelm et al., 2003; Wilhelm et al., 2002). Al estudiar este proceso a 4 y 37°C se observó que a bajas temperaturas solo ocurre la adsorción de las nanopartículas a la membrana plasmática (proceso dependiente de ATP) (Calero et al., 2013). Por otra parte la incubación a 37°C permitía la internalización de las nanopartículas en un proceso de endocitosis que concluía con las nanopartículas confinadas en endosomas tardíos o lisosomas dispersos por el citoplasma (Wilhelm and Gazeau, 2008).

Para confirmar estos resultados se incubaron células Pan02 con las nanopartículas recubiertas con DMSA, las cuales se había observado que eran internalizadas por la célula eficientemente. Se utilizó la sonda fluorescente LysoTracker Red DND-99, específica para identificación de lisosomas. La distribución citoplasmática observada para estas nanopartículas solapaba en gran parte con el marcador utilizado, lo que confirma que las nanopartículas internalizadas son degradadas en el compartimento lisosomal (Figura 37).

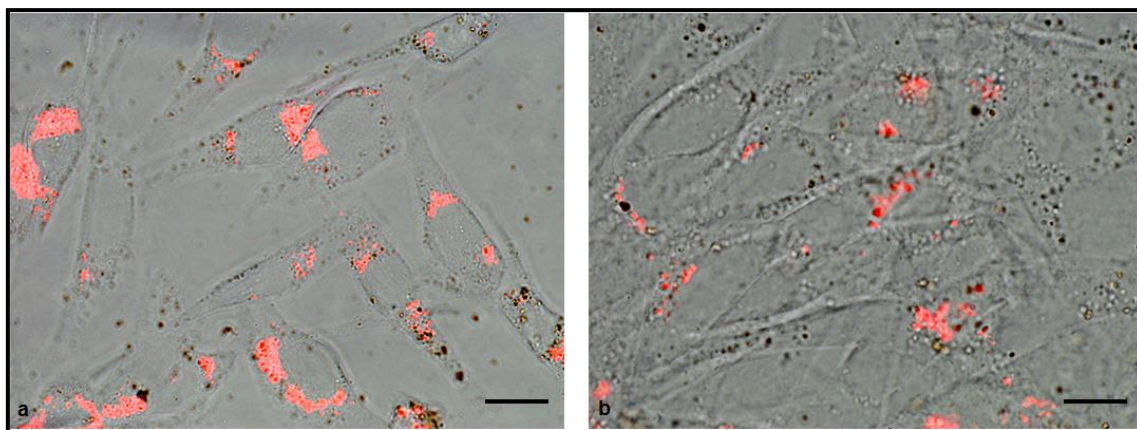


Figura 37. Co-localización de las NP-DMSA con la sonda fluorescente LysoTracker Red en células Pan02. Tras el marcaje las células (30 min) se observaron mediante microscopía de campo claro para visualizar las células y las nanopartículas, y de fluorescencia para visualizar el marcaje. Barra de escala: 10 μ m.

Al comparar el proceso de internalización de las nanopartículas recubiertas con DMSA con diferentes nanopartículas modificadas con PEG se observó que mientras las NP-DMSA resultaban internalizadas eficientemente, las conjugadas a PEG formaban agregados positivos para la tinción con azul de Prusia en la superficie celular (Figura 38)(Ruiz et al., 2013b).

Las nanopartículas con recubrimientos de baja carga superficial, tales como dextrano o el PEG empleado en este estudio, no son internalizadas por las células tumorales, por lo que resultan candidatos ideales para productos de imagen por RMN, sobre todo en el diseño de agentes de contraste de larga vida media en sangre (Na et al., 2009). Sin embargo, modificaciones posteriores de las nanopartículas por la unión por ejemplo de un péptido, podría modificar la interacción nanopartícula-célula y volver a permitir la internalización. Por tanto, se hace necesario el estudio de toxicidad para cada material desarrollado.

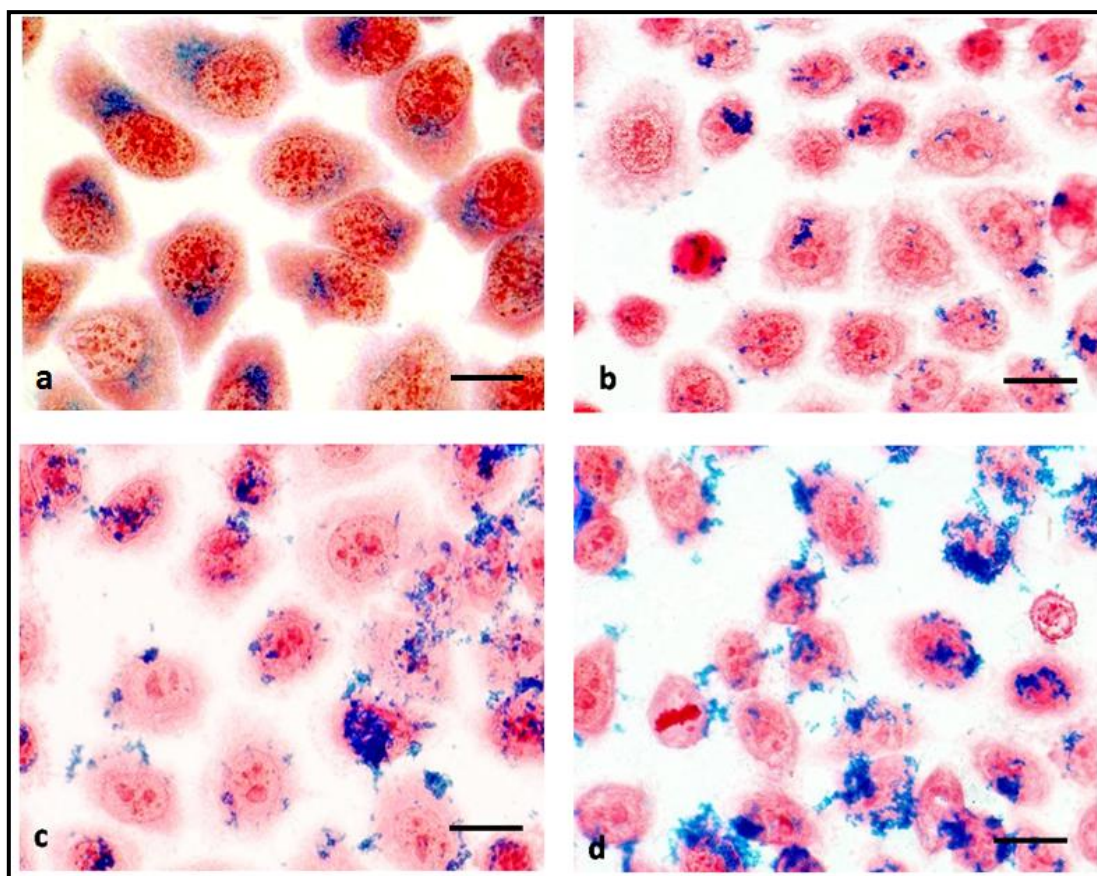


Figura 38. Tinción con azul de Prusia de las células HeLa (A: NP-DMSA, B: NP-PEG-NH₂, C: NP-PEG-(NH₂)₂, D: NP-PEG-Prop-(NH₂)₂) después de 24 horas de incubación en presencia de las nanopartículas a 0,3 mg/mL de hierro. Barra de escala: 10 μm.

5.3. Viabilidad celular

Dentro de los posibles efectos que dependen de la captación e internalización de nanopartículas en las células se encuentran la citotoxicidad directa, a corto plazo, en la que se incluyen la afectación del metabolismo celular, alteraciones en la integridad de la membrana plasmática o lisosomal, alteración en el metabolismo mitocondrial, generación de ROS o genotoxicidad (Soenen and Cuyper, 2009). Como se puede observar en la Tabla 7, uno de los métodos más utilizados en la caracterización de la citotoxicidad asociada a las nanopartículas magnéticas, es el método MTT. El ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 dimetiltetrazolio), determina la actividad e integridad mitocondrial de las células. La succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias rompe el anillo de tetrazolio generando el formazán de color morado, en aquellas células que mantienen su actividad mitocondrial intacta (Mosmann, 1983).

Para analizar si existían diferencias en la viabilidad celular en presencia de NP-DMSA o NP-PEG-(NH₂)₂ se realizó un ensayo MTT en diferentes líneas celulares que habían sido incubadas durante 24 h con las nanopartículas a una concentración de 0,3 mg/mL. Los resultados indicaron que tras 24 horas de incubación, las células presentaron porcentajes de viabilidad similares a los controles (Figura 39).

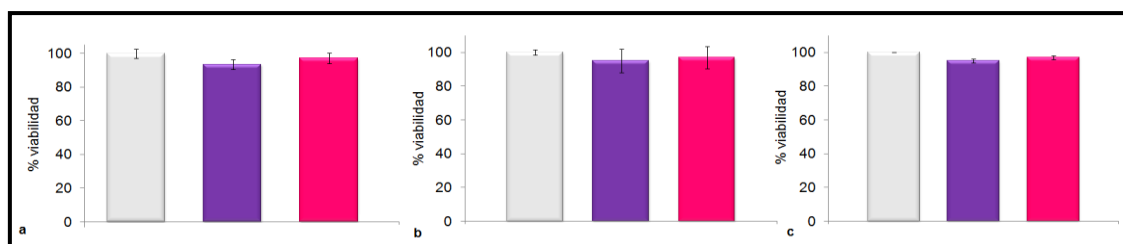


Figura 39. Análisis de la citotoxicidad mediante un ensayo de MTT de las nanopartículas incubadas durante 24 h a 0,3 mg/mL de hierro en diferentes líneas celulares (A: HeLa, B: Pan02 y C: HepG2) NP-DMSA (■) y NP-PEG-(NH₂)₂ (■). Los datos representan las medias \pm D.E. (n=6) del porcentaje de células viables, tomando como control (100%) de las células sin tratar (□).

Además de los efectos citotóxicos directos que evalúa el MTT, las nanopartículas podrían generar otros efectos a largo plazo en las células. Cambios en la arquitectura del citoesqueleto, podrían producir alteraciones en la morfología celular, una reducción en la capacidad proliferativa, defectos en la migración o en la diferenciación celular, etc (Soenen and Cuyper, 2009). Por tal motivo se estudió la proliferación celular en tiempo real hasta 150 h de cultivo mediante un analizador xCELLigence RTCA-DP. El sistema permite la medición de la impedancia en el fondo del pocillo de cultivo que se encuentra conectado a unos microelectrodos a través de los cuales se aplica una corriente de 20 mV a una frecuencia de 25 kHz. Al aumentar el número de células en el fondo del pocillo se produce un aumento de la impedancia que se puede correlacionar con la viabilidad celular y la capacidad de proliferación y migración de las células. El software del equipo (versión: RTCA 1.2.1) permite el cálculo del índice de crecimiento celular, que es un valor obtenido a partir de la división de la impedancia entre la frecuencia (M.R. Cimpan et al., 2013).

Teniendo en cuenta que el objetivo final de estas nanopartículas es su aplicación en biomedicina, estas estarán en contacto en el organismo con diferentes tipos celulares, así como con células sanas o enfermas. De ahí que se decidió estudiar la posible afectación que pueden provocar las nanopartículas en 2 líneas de igual origen (tejido mamario), una línea normal (MCF-10) y otra tumoral (MCF-7). Para analizar si existían diferencias en la viabilidad celular en presencia de las NP-DMSA o NP-PEG-(NH₂)₂ se realizó un análisis con distintas dosis de nanopartículas en el medio de cultivo (0,1; 0,3 ó 0,5 mg/mL) hasta 150 h de tiempo de incubación (Figura 40). Se utilizó además una dosis por encima de la dosis

máxima recomendada a partir de los resultados del MTT para saber si las células podrían recuperarse. El gráfico representa la media de 3 réplicas de cada condición experimental.

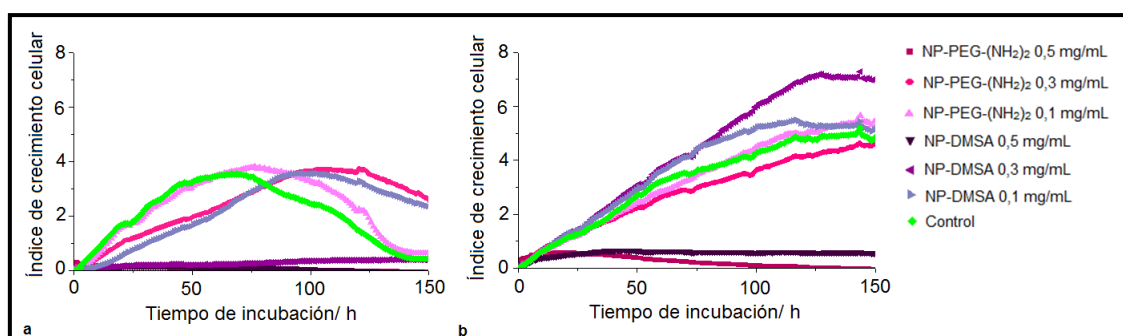


Figura 40. Análisis de la viabilidad celular en tiempo real de células incubadas a distintas concentraciones de nanopartículas. A) MCF-10, B) MCF-7.

Como se puede observar en la Figura 40 cada línea celular presenta cinéticas de crecimiento diferente. Sin embargo al comparar la influencia de las nanopartículas respecto a su control (células incubadas sin tratamiento), se pudo observar que sólo a altas concentraciones de nanopartículas (0,5 mg/mL) había un efecto tóxico a causa de las nanopartículas que inhibía la proliferación celular.

La combinación del método MTT con el análisis en tiempo real de la proliferación celular en presencia de las nanopartículas ha permitido observar que no existe toxicidad directa o indirecta asociada a las nanopartículas en diferentes líneas celulares hasta concentraciones de 0,3 mg/mL. El método MTT al cuantificar directamente la actividad enzimática succinato deshidrogenasa, que es un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en rutas metabólicas claves como el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular y no se ha afectado la integridad estructural de dicho organelo. Por otra parte el análisis en tiempo real de la proliferación celular brinda información acerca de que las nanopartículas no provocan alteraciones en los procesos de crecimiento, división y migración celular. Las nanopartículas tampoco afectan la morfología de las células como se ha podido observar mediante la microscopía óptica. Finalmente, el hecho de que la modificación superficial de las nanopartículas permita que unas sean internalizadas (NP-DMSA) mientras que otras permanecen adheridas a la membrana plasmática (NP-PEG-(NH₂)₂) posibilita su aplicación en diversas formas de terapia; ya sea en aplicaciones como la hipertermia y la liberación controlada de fármacos o como agentes de contraste en MRI con un tiempo de vida media en sangre incrementado.

5.4. Hematotoxicidad

La Hemostasia o hemostasis es el conjunto de mecanismos aptos para hacer que la sangre circule en estado líquido en los vasos sanguíneos. La hemostasia regula además que cuando una de estas estructuras se ve dañada, tengan lugar los mecanismos de formación de coágulos para detener la hemorragia, así como los procesos de disolución de trombos (Fibrinólisis) (Gentry, 2004). El proceso de coagulación se produce después de una lesión de los vasos sanguíneos a través de dos mecanismos: (1) la hemostasia primaria, en el que las plaquetas forman de inmediato un tapón en la sitio de la lesión, y (2) la hemostasia secundaria, que tiene dos vías: (i) la vía intrínseca (vía de propagación) que opera con la ayuda de muchos componentes proteicos del plasma sanguíneo, conocidos como factores de coagulación, y (ii) la vía extrínseca (la vía de iniciación) que opera con la ayuda del factor tisular (TF) en el daño vascular. La eficiencia de la vía intrínseca se puede evaluar midiendo el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), mientras que la eficacia de la vía extrínseca puede ser evaluada midiendo el tiempo de protrombina (PT). Ambas vías conducen a la formación de hebras de fibrina, cuya función es fortalecer el tapón de plaquetas (Figura 41).

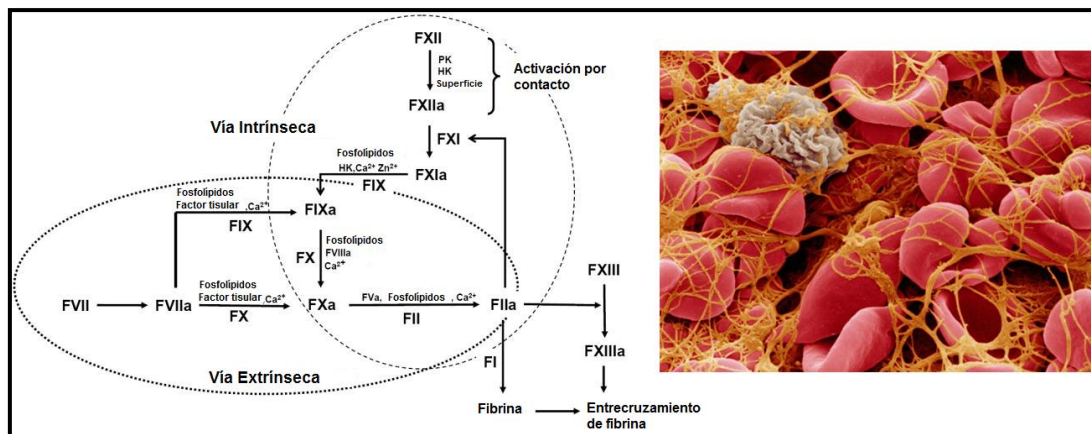


Figura 41. Diagrama simplificado de la cascada de coagulación que muestra la intersección de las vías intrínseca y extrínseca. (Adaptado de (Vogler and Siedlecki, 2009)).

Teniendo en cuenta que la preparación de estas nanopartículas tiene un fin biomédico, al ser administradas entrarán en contacto con los diferentes componentes de la sangre. Sin embargo no existen muchos trabajos que aborden la hematotoxicidad asociada a tratamientos con nanopartículas magnéticas (Ali et al., 2013). En este trabajo realizado en colaboración con el Dr. Angel Millán (Universidad de Zaragoza) se ha

estudiado el efecto de las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas PEG, así como de sus componentes por separado, en el proceso de coagulación mediante la medición de los tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) y de protrombina (PT). Además, mediante el conteo de eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y las plaquetas en la sangre se estudió la presencia de posibles efectos hemolíticos de las nanopartículas y estos resultados se corroboraron *in vivo*.

5.4.1. Análisis *in vitro*

Para los estudios de coagulación se colectaron muestras de sangre de humanos voluntarios sanos añadiéndolas a viales que contenían 0,129 M de citrato. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El plasma se procesó para los estudios de coagulación de TTPa y PT utilizando el coagulómetro TOP-ACL de IL-Instrumentación. Los resultados estuvieron dentro de los límites de referencia (23-37 s. y 9-14 s respectivamente). Igualmente se colectaron muestras de sangre añadiéndole inmediatamente un volumen de EDTA (1,8 mg/mL) correspondiente al 10 % del volumen total, para analizar una posible variación del conteo de eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y las plaquetas en un analizador Coulter LH 780 en presencia de las nanopartículas.

Como se puede observar en la Figura 42A, el tiempo de protrombina, como parámetro indicador de la eficacia de la vía extrínseca no se vio afectado por la presencia de las nanopartículas conjugadas a PEG. Sólo se observaron diferencias significativas con respecto al control en la muestra tratada con NP-DMSA a una concentración de 0,29 g/L de nanopartículas en el medio. En este caso se observó una disminución del valor de PT a $8,52 \pm 0,40$ s con respecto al control ($10,07 \pm 0,56$ s).

Por otra parte la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada como medidor de la eficacia de la vía de coagulación intrínseca muestra un incremento en presencia de las nanopartículas en todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, el incremento observado para las nanopartículas conjugadas a PEG es significativamente menor que en el caso de los tratamientos con NP-DMSA.

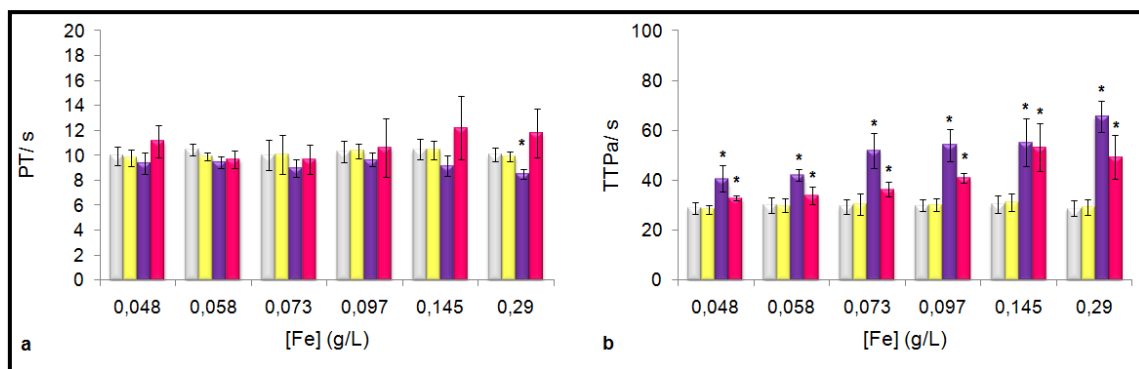


Figura 42. Influencia de las nanopartículas en: A) Los tiempos de protrombina (PT), B) Tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos. Los valores representan la media \pm D.E. (n=6 para las NPs y PBS [■], n=12 para los controles [□]), Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con $p < 0.05$ entre las muestras tratadas con nanopartículas, PBS y el control. NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH₂)₂ [■].

También se analizó el posible efecto que tendría la presencia de las moléculas del recubrimiento en su forma libre (DMSA y PEG-NH₂)₂ en las muestras de sangre (Figura 43). Para ello se seleccionaron dos concentraciones de trabajo que son hasta 3 veces mayores que la cantidad de DMSA o PEG unido a las nanopartículas detectada por los análisis de termogravimetría.

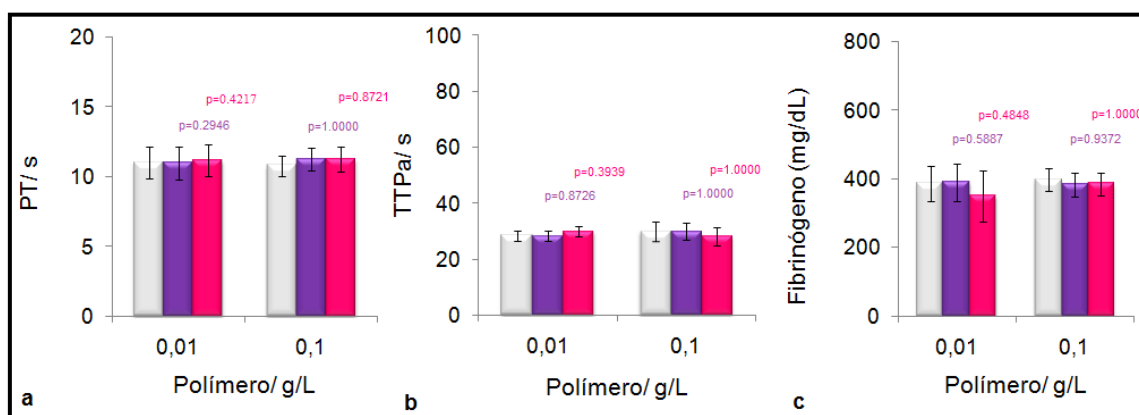


Figura 43. Influencia de componentes del recubrimiento en su forma libre sobre: A) Tiempos de protrombina (PT), B) de tromboplastina parcial activada (TTPa) en segundos, C) Fibrinógeno en mg/dL. Los valores representan la media \pm D.E. (n=6) Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con $p < 0.05$ entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH₂)₂ [■].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos donde ambos tipos de nanopartículas incrementaron los tiempos de tromboplastina parcial activada, no así las moléculas del recubrimiento en su forma libre, se hace compleja la explicación de este fenómeno.

Tradicionalmente se ha observado que las superficies aniónicas inducían la activación de la vía intrínseca de la cascada de coagulación a través del proceso de

activación del zimógeno del factor FXII en la forma activa de la enzima FXIIa. Sin embargo, estudios recientes sugieren que este proceso no es dependiente de superficies aniónicas, sino que está regulado por un equilibrio entre la adsorción-liberación de la enzima en su forma activa (Vogler and Siedlecki, 2009). Es posible que las nanopartículas interactúen con el factor FXII desplazando el equilibrio hacia la forma adsorbida e inactiva y afectando por tanto la vía intrínseca de la coagulación. Por otra parte estudios donde ha habido un incremento de TTPa a partir del tratamiento con diferentes nanopartículas aniónicas, este resultado solo se ha observado en los ensayos *in vitro* como el realizado en este trabajo, y no en los tratamientos *in vivo* donde utilizan ratas como modelo animal (Song et al., 2010).

Esto podría indicar que la afectación se debe a la interacción con los componentes no celulares del plasma, mientras que *in vivo* la interacción de las nanopartículas con la sangre es mucho más compleja. Para confirmar esta hipótesis se analizaron los conteos de eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y las plaquetas con el objetivo de descartar posibles afectaciones en los componentes celulares de la sangre así como riesgo de hemólisis en presencia de las nanopartículas (Figura 44).

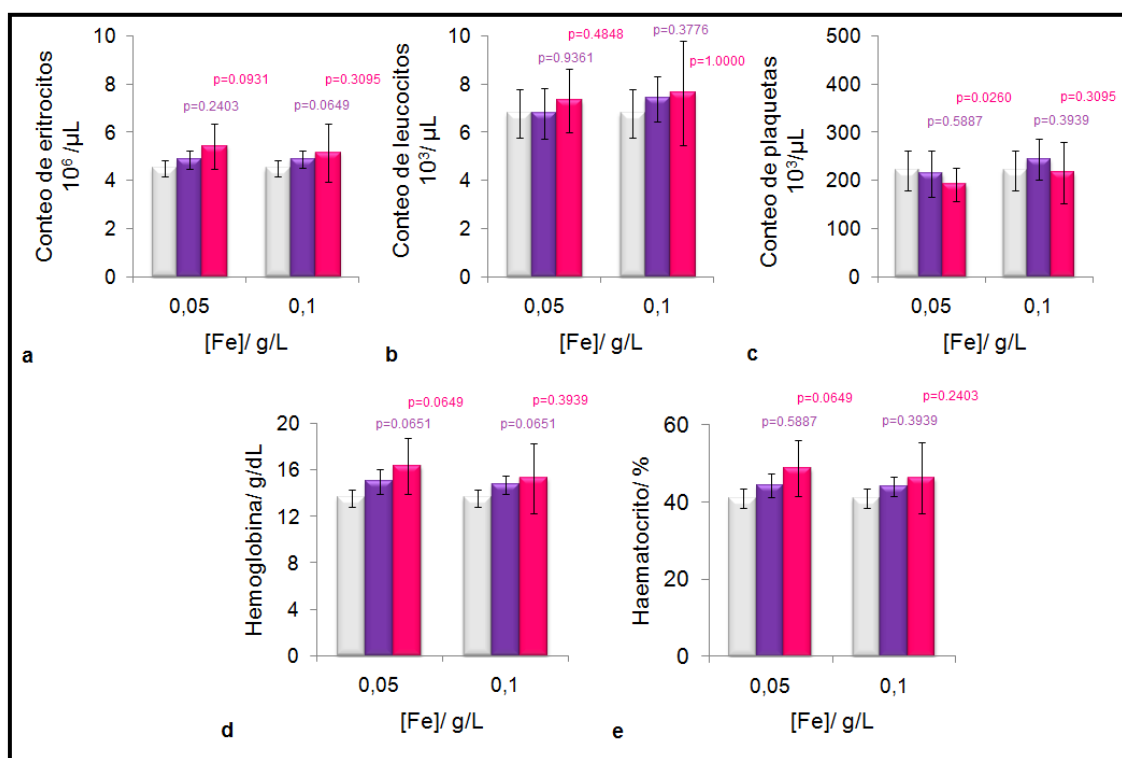


Figura 44. Influencia de las nanopartículas sobre diferentes parámetros hematológicos: eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas. Los valores representan la media \pm D.E. (n=6). Prueba de Mann-Whitney, (*) existen diferencias significativas con $p < 0.05$ entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH₂)₂ [■].

Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas en los parámetros hematológicos analizados entre las muestras tratadas con ambos tipos de partículas a diferentes concentraciones con respecto al control. Estos datos mostraron la ausencia de toxicidad de las nanopartículas en relación a diferentes componentes celulares de la sangre, así como ausencia de riesgo hemolítico ya que los valores de hemoglobina y hematocrito permanecieron dentro del rango de valores normales.

5.4.2. Análisis *in vivo*

Con el objetivo de corroborar *in vivo* los resultados obtenidos en la sección anterior sobre la influencia de las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG en diferentes parámetros hematológicos, se analizó en un modelo animal de ratas Wistar, el efecto del tratamiento con nanopartículas. Para ello se colectó una muestra de sangre periférica (1 mL) mediante punción intracardiaca a las 24 horas, 7, 15 y 30 días después de la administración de nanopartículas a una dosis de 2,5 mg / kg de peso corporal (Figura 45).

A las muestras de sangre se les añadió inmediatamente un volumen de EDTA (1,8 mg/mL) correspondiente al 10 % y fueron analizadas en un hematómetro automático Sysmex pocH-100i™.

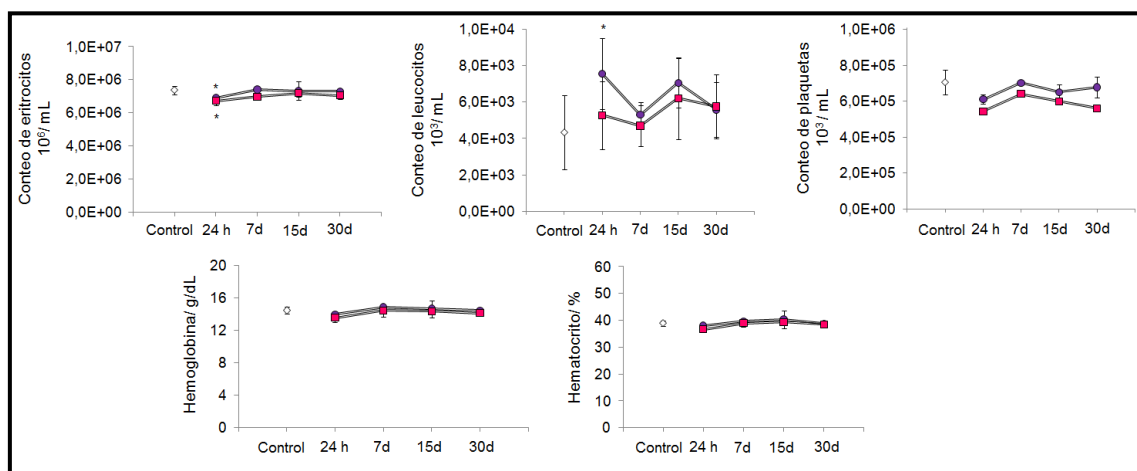


Figura 45. Influencia de las nanopartículas sobre diferentes parámetros hematológicos evaluados en ratas Wistar a las que se les administró una dosis de 2,5 mg Fe/ kg de peso corporal: eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas. Los valores representan la media \pm D.E. (n=4) Prueba de Dunnett, (*) existen diferencias significativas con $p < 0.05$ entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [◊], NP-DMSA [●], NP-PEG-(NH₂)₂ [■].

Los resultados mostraron que existe una ligera disminución con carácter significativo del conteo de eritrocitos 24 horas después de administradas las nanopartículas, así como un incremento en el conteo de células blancas para el caso de las ratas tratadas con NP-DMSA (Figura 45 y Tabla 8). Esta reacción probablemente esté asociada al reconocimiento de las nanopartículas por el sistema inmune después de la administración de las nanopartículas. Esta reacción no se observa para las nanopartículas modificadas con PEG debido a las propiedades del polímero de aumento de la biocompatibilidad del material y reducción de la inmunogenicidad.

Los resultados completos del análisis de los parámetros hematológicos se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los parámetros hematológicos evaluados en ratas Wistar después de administrar las nanopartículas a una dosis de 2,5 mg/kg.

| | 24 hours | | | 7 days | | 15 days | | 30 days | |
|--|----------|------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Control | NP-DMSA | NP-PEG | NP-DMSA | NP-PEG | NP-DMSA | NP-PEG | NP-DMSA | NP-PEG |
| Leucocitos | 4,33E+03 | 7,55E+03* | 5,28E+03 | 5,30E+03 | 4,70E+03 | 7,05E+03 | 6,20E+03 | 5,58E+03 | 5,75E+03 |
| Eritrocitos | 7,37E+06 | 6,90E+06* | 6,73E+06* | 7,41E+06 | 6,97E+06 | 7,34E+06 | 7,18E+06 | 7,30E+06 | 7,05E+06 |
| Hemoglobina, g/dL | 14,475 | 13,95 | 13,55 | 14,85 | 14,45 | 14,65 | 14,35 | 14,45 | 14,125 |
| Hematocrito, % | 38,925 | 37,95 | 36,6 | 39,65 | 38,9 | 40,3 | 39,3 | 38,725 | 38,5 |
| Volumen Corpuscular Medio, fL | 52,8 | 55 | 54,4 | 53,55 | 55,8 | 54,95 | 54,7 | 53,125 | 54,675 |
| Hemoglobina Corpuscular Media pg | 19,65 | 20,2 | 20,125 | 20,05 | 20,75 | 19,975 | 20 | 19,85 | 20,075 |
| Concentration Media de Hemoglobina Corpuscular, g/dL) | 37,175 | 36,75 | 37,025 | 37,45 | 37,15 | 36,35 | 36,525 | 37,3 | 36,7 |
| Plaquetas | 587000 | 611250 | 543750 | 702000 | 640500 | 650250 | 599750 | 678000 | 560000 |
| Linfocitos % | 70,45 | 74,075 | 63 | 70,85 | 76,2 | 60,95 | 76,1 | 74,325 | 74,275 |
| Neutrófilos y Monocitos % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Eosinófilos % | 29,55 | 25,925 | 37,125 | 29,15 | 23,8 | 39,05 | 23,9 | 25,675 | 25,725 |
| Linfocitos, x /mL | 2575 | 5675 | 3275 | 3750 | 3600 | 4275 | 4625 | 4150 | 4300 |
| Neutrófilos y Monocitos, x /mL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|---|--------|-------|-------|------|------|--------|--------|--------|--------|
| Eosinófilos, x /mL | 1000 | 1875 | 2000 | 1550 | 1100 | 2775 | 1575 | 1425 | 1450 |
| Distribución de células rojas | 24,75 | 24,95 | 24,8 | 24,7 | 26,8 | 25,725 | 25,175 | 24,825 | 25,275 |
| Distribution del volume de eritrocitos % | 10,675 | 9,35 | 9,2 | 9,9 | 10,7 | 10,3 | 9,75 | 9,825 | 9,8 |
| Distribución de plaquetas | 8,225 | 8,85 | 8,2 | 8 | 8,05 | 7,85 | 8,1 | 7,9 | 8,6 |
| Volumen medio de plaquetas, fL | 7 | 7,375 | 6,925 | 6,75 | 7,1 | 6,7 | 7,1 | 6,95 | 7,175 |
| Relación de plaquetas de tamaño grande | 4,95 | 7,55* | 5,525 | 4,45 | 6,2 | 4,75 | 5,825 | 5,25 | 7,25 |

5.4.2.1. Estudio de genotoxicidad

Con el fin de analizar posibles daños asociados a genotoxicidad provocados por la administración de las nanopartículas en los animales estudiados, se llevó a cabo un ensayo de Cometa. Este ensayo permite clasificar el nivel de daño en el ADN de las células presentes en las muestras de sangre periférica extraída (Collins, 2004).

Las muestras de sangre son mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (0,5 %) y depositadas sobre un portaobjetos previamente recubierto de agarosa al 1,5 %. Estos portaobjetos son sumergidos en una solución de lisis para exponer el nucleóide que contiene el ADN superenrollado. Posteriormente son sometidos a una electroforesis a pH= 13,5. Las células que presenten daños en el material genético al migrar forman una especie de cometa debido a las roturas de la cadena de ADN. Posteriormente estas son fijadas en metanol y teñidas con bromuro de etidio. La microscopía de fluorescencia permitió clasificar el tipo de daño en función de la relación entre el tamaño de la cabeza y el tamaño de la cola (Figura 46 A).

Se analizaron 150 células de cada animal y se clasificaron según el tipo de daño. Con los resultados de la prueba de Cometa se calculó el índice de daño (ID) y el porcentaje de daño total, daño moderado y daño elevado, cuyas fórmulas se muestran a continuación (Jałoszyński et al., 1997):

$$ID = \frac{(N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4)}{\frac{S}{100}}$$

$$\% \text{ Daño total} = \frac{ID * 100}{400}$$

$$\% \text{ Daño moderado} = \frac{(100 * (N_1 + N_2))}{400}$$

$$\% \text{ Daño elevado} = \frac{(100 * (N_3 + N_4))}{400}$$

El análisis estadístico (Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de un test de Dunnett para la comparación múltiple de muestras vs. control (n =150; *p < 0.05)) de los resultados mostró que no existen diferencias significativas entre los animales tratados y el control (Figura 46B). Con este resultado se ha podido demostrar que las nanopartículas no tienen efectos genotóxicos asociados a su tratamiento a la dosis estudiada.

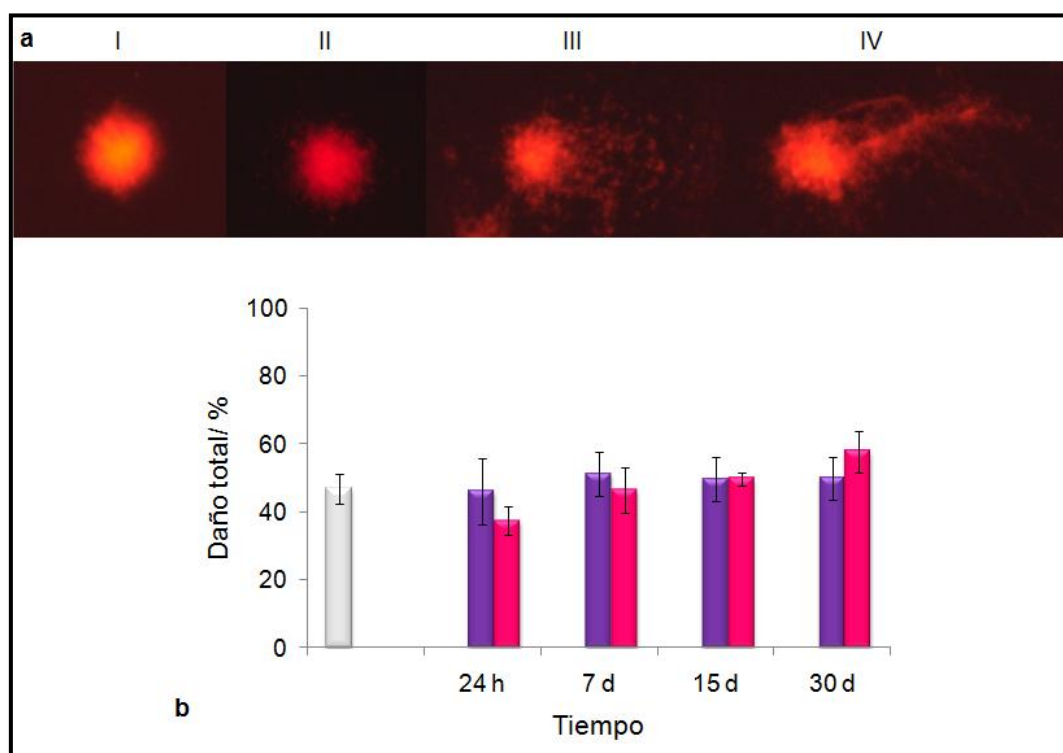


Figura 46. Ensayo de Cometa para muestras de sangre procedentes de ratas Wistar a las que se les administró una dosis de 2,5 mg Fe/ kg de peso corporal. A) Clasificación de los niveles de daños según (Jałoszyński et al., 1997). B) Porcentaje de daño total observado en los diferentes tratamientos. Prueba de Dunnett, (*) existen diferencias significativas con p < 0.05 entre las muestras tratadas con nanopartículas y el control. Control [□], NP-DMSA [■], NP-PEG-(NH₂)₂ [■].

Capítulo 6. Biodistribución y eliminación

6.1 Detección y cuantificación

*6.2 Tiempo de residencia en
sangre*

6.3 Biodistribución

6.4 Metabolismo del hierro

Capítulo 6. Biodistribución y eliminación

Uno de los principales retos que lleva este desarrollo de la nanotecnología en el área de biomedicina es el estudio de la biodistribución de los sistemas nanoparticulados en el organismo, después de su administración sistémica a través de cualquier ruta. Esto está ligado a una segunda preocupación, que implica el desarrollo de técnicas para la detección y cuantificación de esa biodistribución (Sanhai et al., 2008).

La comprensión de los mecanismos que gobiernan la interacción nanopartícula-sistema biológico, es la única forma posible de desarrollar la nanotecnología de forma segura (Casals et al., 2012) y prever la acumulación de las nanopartículas en un órgano o tejido determinado, asegurando así la efectividad de un tratamiento y evitando efectos secundarios. Muestra de la importancia en este tema son los esfuerzos emprendidos por los gobiernos de Estados Unidos, Europa y Japón que han destinado grandes recursos al desarrollo de programas de evaluación de riesgos y bioseguridad de estos productos (Thomas et al., 2006).

En este capítulo se han utilizado diferentes métodos para la detección y cuantificación de nanopartículas magnéticas en dos modelos animales, ratas y conejos, en función del recubrimiento. Se mostrarán las ventajas y limitaciones de dichos métodos también en función de la dosis utilizada (0.5 y 2.5 mg/Kg).

6.1. Detección y cuantificación

La detección y cuantificación de nanopartículas magnéticas en una matriz biológica, es una tarea compleja ya que se hace necesaria la combinación de varias técnicas para obtener datos cuantitativos de la presencia de las nanopartículas y de sus propiedades estructurales, así como de los procesos de transformación que tienen lugar a largo plazo (Levy et al., 2011; Mejías et al., 2013). Una gran ventaja de las nanopartículas magnéticas utilizadas en diferentes aplicaciones biomédicas (principalmente basadas en óxido de hierro) es su carácter superparamagnético, que permite el uso de diferentes metodologías para la detección de las nanopartículas *in vivo* y *ex vivo* mediante la combinación de

métodos magnéticos y no magnéticos, aunque el número de tales estudios todavía es limitado (Arora et al., 2012; Gu et al., 2012; Levy et al., 2011; Ruiz et al., 2013a; Tseng et al., 2012; Valois et al., 2010).

Los métodos no magnéticos se basan en la detección del contenido de hierro presente en las muestras biológicas. El uso de la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) permite la identificación del elemento en la muestra, lo mismo que la tinción con Azul de Prusia permite localizar agregados de nanopartículas de óxido de hierro en cortes de tejidos. Sin embargo, ambos métodos carecen de especificidad para distinguir entre el hierro endógeno y las nanopartículas, más aún aquellas que han sido inyectadas a bajas dosis (Arora et al., 2012; Valois et al., 2010). La eficacia cuantitativa de estos métodos es baja, ya que por lo general, el hierro detectado correspondiente a las nanopartículas representa menos de un 10% de la cantidad de este elemento presente de forma natural en órganos como el hígado (Andrews, 1999).

Los métodos magnéticos se basan en la variación de las propiedades magnéticas en el entorno biológico causadas por la presencia de las nanopartículas (Gu et al., 2012; Gutiérrez et al., 2011; Levy et al., 2011; Tseng et al., 2012). El comportamiento magnético de un órgano es la suma de los comportamientos magnéticos debidos a la presencia de las nanopartículas (superparamagnético), el hierro endógeno asociado a ferritina, hemosiderina o hemoglobina (paramagnético) y las distintas biomoléculas que forman el tejido (diamagnético). Dependiendo de la cantidad de cada uno de estas partes en la muestra, el comportamiento magnético puede estar dominado por uno u otro de los componentes (Figura 47). Otra ventaja de emplear métodos basados en el estudio de las propiedades magnéticas de los tejidos implica por lo general el análisis de una fracción del órgano (50-100 mg) mucho mayor que a la que se tiene acceso al emplear técnicas de microscopía óptica o electrónica, con lo cual la información obtenida es más representativa del órgano analizado (Lopez et al., 2007).

La obtención de curvas de magnetización a temperatura ambiente ha demostrado ser un método muy eficiente en la detección de nanopartículas magnéticas en estudios de biodistribución a partir de la cuantificación de su momento magnético, sobre todo cuando se utilizan dosis altas, ~5-10 mg/kg (Levy et al., 2011).

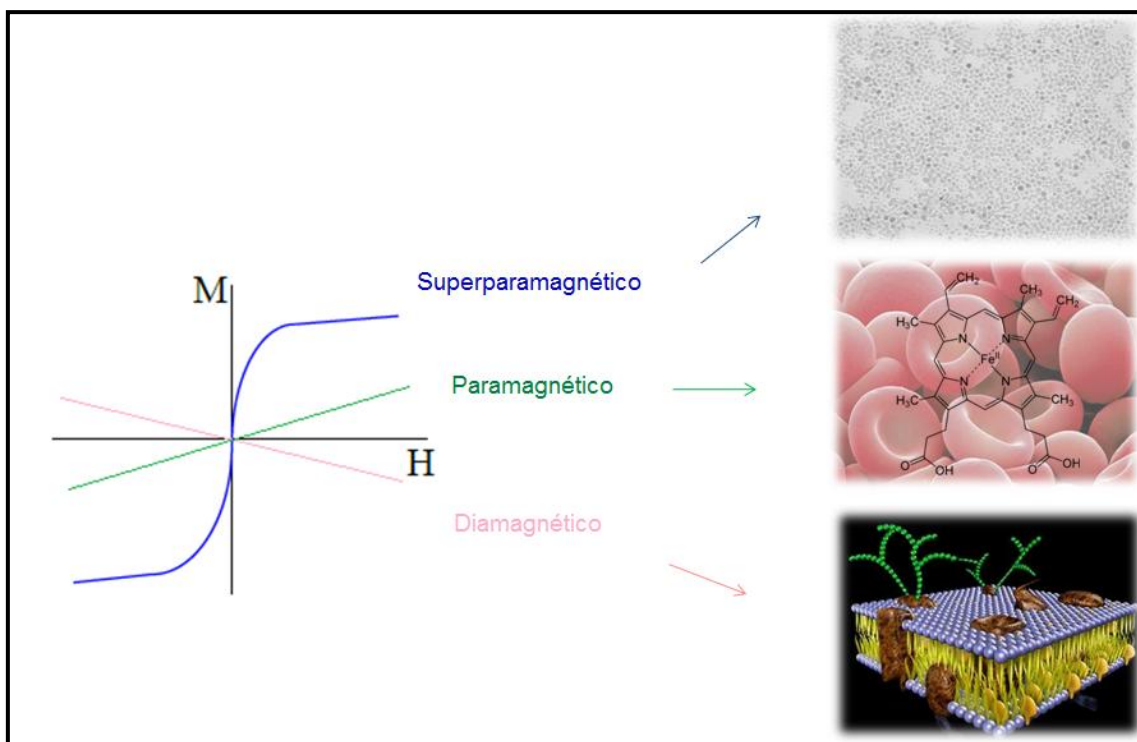


Figura 47. Comportamiento magnético de los distintos componentes de un órgano, incluyendo la presencia de nanopartículas magnéticas (superparamagnético), hierro endógeno (paramagnético) y tejido (diamagnético).

La susceptibilidad AC es el método más sensible para la cuantificación de las nanopartículas presentes en muestras de tejidos. Este tipo de medidas permite diferenciar y cuantificar los distintos tipos de material magnético presente en una muestra, de forma que podemos distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los órganos extraídos y la que se debe a otros componentes magnéticos que pueda contener el tejido (ferritina). Sin embargo, este método requiere un secado cuidadoso de las muestras y mediciones en vacío a bajas temperaturas (Gutiérrez et al., 2011). Otras técnicas utilizadas frecuentemente en los estudios de detección de nanopartículas magnéticas en muestras de células o tejidos son la Resonancia de Spin del Electrón (Chaves et al., 2002), la Resonancia Ferromagnética (Gamarra et al., 2010) o el ultrasonido (Oh et al., 2006).

Por otra parte, la imagen por resonancia magnética nuclear, que es un método no invasivo, es una técnica complementaria ideal para seguir la biodistribución de las nanopartículas, así como el proceso de degradación de las mismas (Mejías et al., 2010; Ruiz et al., 2013a). Esta técnica puede medir propiedades magnéticas *in vivo*, pero el análisis cuantitativo es más difícil, ya que la señal de resonancia magnética de las nanopartículas está afectada por el entorno biológico y si la acumulación de partículas es grande puede saturarse la señal (Westbrook, 2002).

6.2. Tiempo de residencia en sangre

Existen determinados factores que condicionan el comportamiento de nanopartículas magnéticas *in vivo*: el tamaño de partícula, tipo de recubrimiento superficial y las propiedades magnéticas (Berry, 2009; Chouly et al., 1996; Neuberger et al., 2005). Por otra parte la conjugación a PEG incrementa el tiempo de residencia en sangre de las nanopartículas (Allard-Vannier et al., 2012; Laurent et al., 2008). Debido a las propiedades químico-físicas producto de la conjugación del PEG a las nanopartículas, se obtiene como resultado superficies más repelentes a los procesos de adsorción de proteínas e “invisibles” para el sistema inmunológico (Wattendorf and Merkle, 2008).

Para confirmar estos resultados ya descritos en la literatura para proteínas y partículas, se estudió el tiempo de residencia en sangre de nanopartículas magnéticas de magnetita recubiertas de DMSA y conjugadas a PEG-(NH₂)₂ de 2000 Da, con el mismo tamaño de partícula y valores muy aproximados de tamaño hidrodinámico, empleando dos modelos animales diferentes: ratas Wistar (n=4 por grupo) y como prueba de concepto, conejos Nueva Zelanda (n=1 por grupo). A los animales se les administró una dosis de 0,5 mg Fe/kg de peso del animal. Para el modelo animal tipo conejo, se realizaron extracciones de sangre (0,3 mL) de la vena marginal de la oreja mientras que para el modelo animal tipo rata se realizaron extracciones de sangre (0,2 mL) de la vena de la cola. Se extrajo un volumen de sangre antes de administrar las nanopartículas, que fue utilizado como control de la cantidad basal de hierro y a los 5, 10, 20, 30, 60, 90 and 180 min después de la inyección de las nanopartículas.

El seguimiento de las nanopartículas en sangre se realizó a través de la cuantificación directa del contenido de hierro por análisis elemental (ICP-OES) después de una digestión ácida de cada muestra. También se siguió indirectamente a partir de la medición de los tiempos de relajación T₂ en muestras de sangre que fueron diluidas con PBS hasta una concentración <1 mM de hierro. Los resultados se observan en la Figura 48.

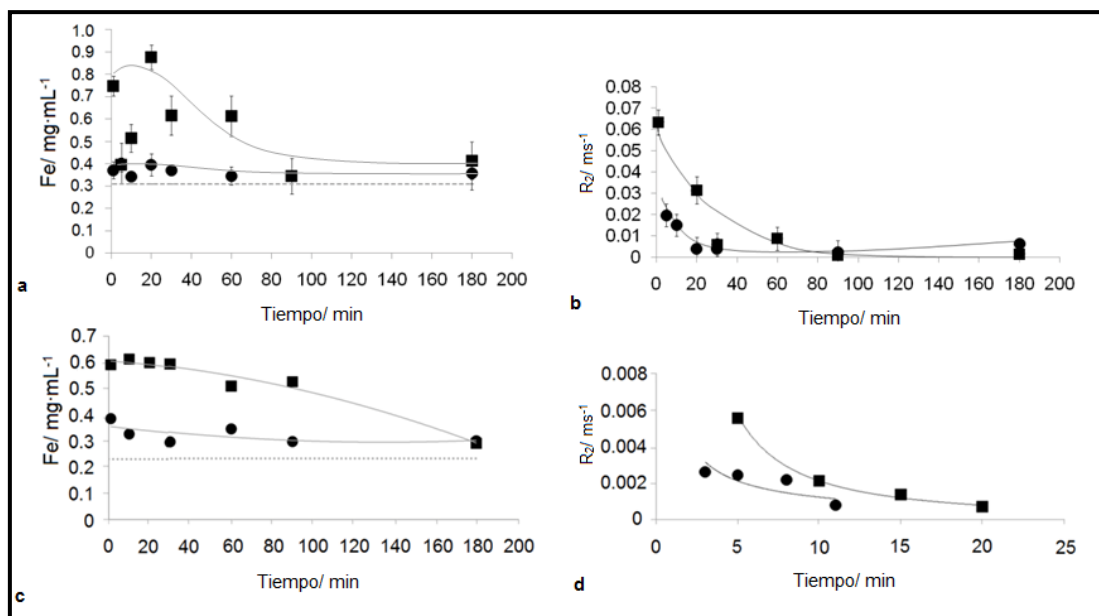


Figura 48. Permanencia de las nanopartículas en sangre después de una administración intravenosa de 0,5 mg/kg de peso del animal. A-B) Ratas Wistar (n=4), C-D) Conejos Nueva Zelanda (n=1). Los valores representan la media \pm D.E. La línea de puntos representa el contenido basal de hierro [(●) NP-DMSA, (■) NP-PEG-(NH₂)₂].

Los datos cuantificados por análisis elemental (ICP-OES) de la concentración de hierro en sangre después de la inyección se compararon con la concentración de hierro endógeno (Control). En conejos, la vida media plasmática de las nanopartículas (tiempo en el que la concentración de partículas en sangre decae a la mitad) se amplió de 30 minutos para NP-DMSA a 90 minutos para NP-PEG-(NH₂)₂ (Figura 48C). La tendencia fue similar en las ratas, en las que la vida media se amplió a 60 minutos para NP-PEG-(NH₂)₂ (Figura 48A). Se observó también la disminución de la señal T₂ (R₂=1/T₂) en las muestras de sangre extraídas a diferentes intervalos de tiempo. Los valores de relaxividad R₂ disminuyeron prácticamente hasta los valores basales en aproximadamente 10 minutos para las NP-DMSA en conejos y ratas, y en 20 minutos para la NP-PEG-(NH₂)₂ en conejos y en > 1 h para las ratas. Al estar empleando técnicas con principios físicos y sensibilidad completamente diferentes, obtenemos valores de tiempo de residencia en sangre diferentes. Sin embargo, mediante ambas técnicas se ha podido comprobar que la modificación con PEG aumenta el tiempo de vida media de las nanopartículas con respecto a las no conjugadas.

El tiempo de vida media en sangre de los agentes de contraste comerciales en ratas Sprague-Dawley es de ~ 6 min a una dosis clínica de RMN (10-20 μ moles Fe/kg = 1 mg/kg), y se acumulan en hígado y bazo pocos minutos después de su administración intravenosa (Ma et al., 2008). En este estudio el análisis del contenido de hierro se realizó mediante la reacción colorimétrica del hierro con o-fenantrolina. En el caso de

nanopartículas modificadas con alginato con radios hidrodinámicos de 200 nm aproximadamente tienen una vida media de 15 min a una dosis de 100 μ moles Fe/kg (5mg/kg) (Wang et al., 2001). Por otra parte se han hecho estudios con nanopartículas recubiertas con DMSA utilizando como modelo animal ratones C57BL/6 y se ha podido determinar mediante la medición de la relaxividad en muestras de sangre que el tiempo de vida media es de ~3 min para nanopartículas de 10 nm y de 15 min para partículas de 4 nm (Mejías et al., 2010).

Se han podido detectar las nanopartículas mediante medidas de relaxividad a una dosis mucho menor que las empleadas en los estudios mencionados (10 μ moles Fe/kg = 0.5 mg/kg), lo cual demuestra la calidad de las partículas que presentan propiedades magnéticas cercanas a las del material masivo gracias al método de síntesis utilizado (Salafranca et al., 2012).

6.3. Biodistribución

En este trabajo se estudió la biodistribución de las nanopartículas empleando dos dosis diferentes (0,5 y 2,5 mg/kg de peso del animal) y hasta 60 días después de la administración intravenosa de las nanopartículas. No se observaron signos externos de toxicidad durante estos experimentos (pérdida de peso, convulsiones, piloerección o caída del pelo, respiración irregular, síntomas gastrointestinales, parálisis o muerte). En el examen visual *post-mortem* no se observaron alteraciones morfológicas en los órganos de tamaño, coloración o forma. A partir de los resultados obtenidos se consideró que la aplicación de las nanopartículas a estas dosis no resultó tóxica para los animales durante el periodo de observación.

Se analizaron mediante diferentes métodos (magnéticos y no magnéticos) aquellos órganos más susceptibles de contener nanopartículas, como son el hígado, el bazo y los riñones, ya que estos órganos son los que median en el metabolismo y eliminación de nanopartículas de hierro del sistema (Andrews, 1999). También se decidió estudiar el contenido de nanopartículas en pulmones, ya que se ha observado que las nanopartículas recubiertas con DMSA tienen una acumulación preferencial en dichos órganos (Chaves et al., 2002; Gutiérrez et al., 2011; Mejias et al., 2011).

6.3.1. Análisis morfológico

Con el objetivo de estudiar la biodistribución de las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG-(NH₂)₂ así como su tiempo de permanencia en diferentes órganos, se realizó un estudio histológico en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Cuba) y la Universidad de Brasilia (Brasil). Los animales (Ratas Wistar, 300 ± 20 g) fueron distribuidos en 3 grupos de tratamientos: NP-DMSA (n=4), NP-PEG-(NH₂)₂ (n=4) y Control (n=4). Se administró una dosis de nanopartículas de 2,5 mg/kg de peso del animal mientras que al grupo control se le administró igual volumen de PBS (0,5 mL). Para el diagnóstico histológico se tomaron fragmentos de pulmón, bazo, riñones e hígado de los animales, en los diferentes tiempos analizados en el estudio. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% o medio Davidson, y se procesaron por el método de inclusión en parafina. Posteriormente fueron teñidas con Hematoxilina/Eosina (H.E) para la determinación de alteraciones histológicas en los tejidos, y la coloración de Perls, específica para la identificación de hierro en los tejidos. La observación y diagnóstico se realizó empleando un microscopio Olympus BX61 o un microscopio Carl Zeiss, Axiostar plus.

Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 9. En la evaluación macroscópica realizada a los animales durante el ensayo, no se observaron alteraciones morfológicas en los órganos previamente seleccionados para el estudio, ni en el resto de los sistemas de órganos de la anatomía del animal. Los cortes de tejido analizados con Hematoxilina/Eosina tampoco mostraron alteraciones en la estructura de los tejidos. La identificación de las nanopartículas se realizó a partir de la reacción positiva del hierro en la coloración de Perls en los órganos muestreados. Esta tinción permitió la identificación de los microagregados de nanopartículas en el hígado en todos los tiempos analizados, y en menor medida en los pulmones. En el análisis de la distribución de las nanopartículas en los cortes de tejido hepático, estas se pueden observar en forma de agregados en el interior de los hepatocitos, especialmente aquellos que rodean las venas centro-lobulares hepáticas (Figura 49 E, F). También se observaron agregados de nanopartículas en otras zonas del parénquima hepático como puede ser el tejido conectivo interlobular o en los sinusoides hepáticos (Figura 49 B, C). Estos resultados coinciden con lo observado en otros modelos animales (primates no-humanos (*Cebus spp.*)) tras la administración de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con DMSA (Monge-Fuentes et al., 2011). También se identificaron las nanopartículas en el parénquima pulmonar, así como en las paredes de los alveolos. La presencia de las nanopartículas en este tejido ya

ha sido descrita en diferentes trabajos (Chaves et al., 2002; Gutiérrez et al., 2011; Mejias et al., 2011).

Tabla 9. Resumen del estudio histológico en ratas Wistar después de administrar las nanopartículas a una dosis de 2,5 mg/kg.

| Grupo | Animales | Hígado | | Pulmones | | Bazo | | Riñones | |
|--|----------|--------|-----------------|----------|-----------------|------|-----------------|---------|-----------------|
| | | H.E. | Perls | H.E. | Perls | H.E. | Perls | H.E. | Perls |
| Control | C1 | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ |
| | C2 | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | C3 | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | C4 | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| NP-DMSA | 3 h | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 24 h | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 7 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 15 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |
| | 30d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |
| | 60 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |
| NP-PEG-(NH₂)₂ | 3 h | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 24h | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 7 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁻ |
| | 15 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |
| | 30d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |
| | 60 d | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ | NA | Fe ⁺ |

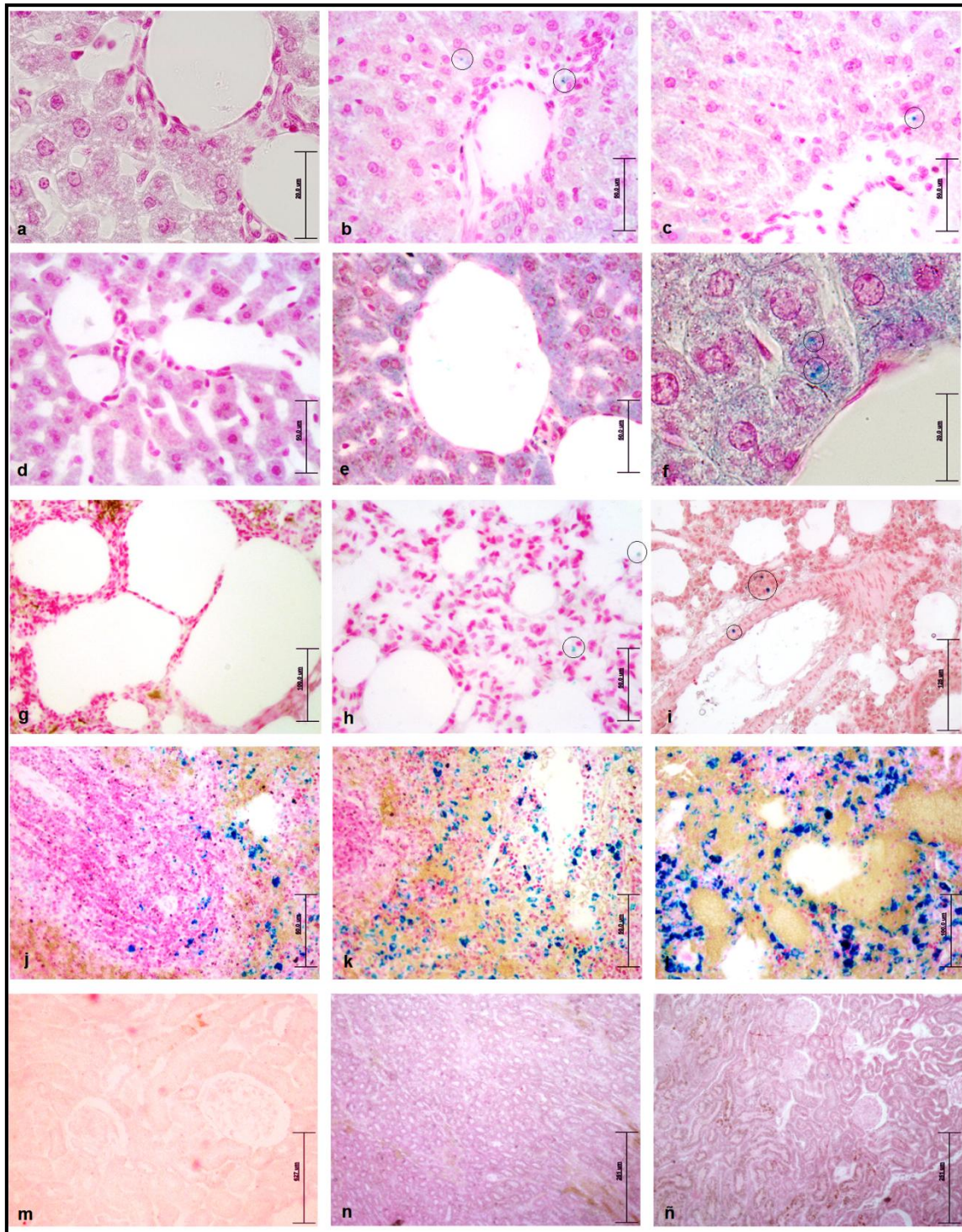


Figura 49. Detección mediante tinción de Perls de las nanopartículas magnéticas acumuladas en diferentes órganos. A) Hígado Control 30 días, B) Hígado NP-DMSA 30 días, C) Hígado NP-DMSA 24 h, D) Hígado Control 24 h, E) Hígado NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días, F) Hígado NP-PEG-(NH₂)₂ 24 h, G) Pulmón Control 24 h, H) Pulmón NP-DMSA 24 h, I) Pulmón NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días, J) Bazo Control 7 días, K) Bazo NP-DMSA 15 días, L) Bazo NP-PEG-(NH₂)₂ 15 días, M) Riñón Control 24h, N) Riñón NP-DMSA 24h, Ñ) Riñón NP-PEG-(NH₂)₂ 24h. Los posibles agregados de nanopartículas se muestran encerrados en un círculo en cada caso.

En la tinción de Perls, el hierro no ligado a la hemoglobina (Fe^{3+}) reacciona con el ferrocianato potásico en solución clorhídrica. En el caso particular del bazo se observó un resultado positivo en la coloración de todas las muestras (tratados y control). Este resultado no puede considerarse de significación diagnóstica para el estudio, ya que dada la función eritrolítica (destrucción de eritrocitos seniles) del mismo, y el consiguiente movimiento del hierro contenido en el grupo hemo de los globulos rojos, siempre se obtiene la identificación de este elemento con la tinción de Perls, incluso en el control (Figura 49).

La tinción de Perls como herramienta histológica para la caracterización morfológica de los tejidos, e identificación del contenido de hierro como forma de seguimiento de las nanopartículas resulta muy útil y orientadora. Sin embargo esta reacción es inespecífica en la identificación de las diferentes formas en que puede encontrarse el hierro en los órganos: unido a ferritina, hemosiderina o en nuestro caso, formando también agregados de nanopartículas (Greaves, 2012). De ahí que se haga necesario emplear métodos más precisos en la identificación y cuantificación de las nanopartículas de óxido de hierro presentes en aquellos tejidos donde la tinción de Perls resultó positiva.

6.3.2. Análisis elemental

Otro método empleado para la detección y cuantificación de las nanopartículas fue la cuantificación de hierro mediante análisis elemental (ICP-OES). En el caso de los animales a los que se les administró una dosis (i. v.) de nanopartículas de 0,5 mg/kg de peso del animal, fueron sacrificados a las 3 horas y se colectaron el hígado, los pulmones y el bazo. Los órganos fueron liofilizados y digeridos posteriormente en HNO_3 para la detección del hierro por ICP-OES. Los resultados se observan en la Figura 50.

El ICP-OES mide la cantidad total de hierro elemental en una muestra. A pesar de su gran sensibilidad, este método espectroscópico resulta inespecífico, ya que es incapaz de distinguir el hierro de las nanopartículas administradas del contenido de hierro endógeno del organismo. Del hierro total detectado, un 75% se corresponde al contenido en el hígado, mientras que en el bazo se acumula un 3%. El análisis estadístico de los resultados mostró, que a pesar de ser una técnica de alta sensibilidad no se observan diferencias significativas cuando se analizan órganos ricos en hierro como es el caso del hígado y el bazo.

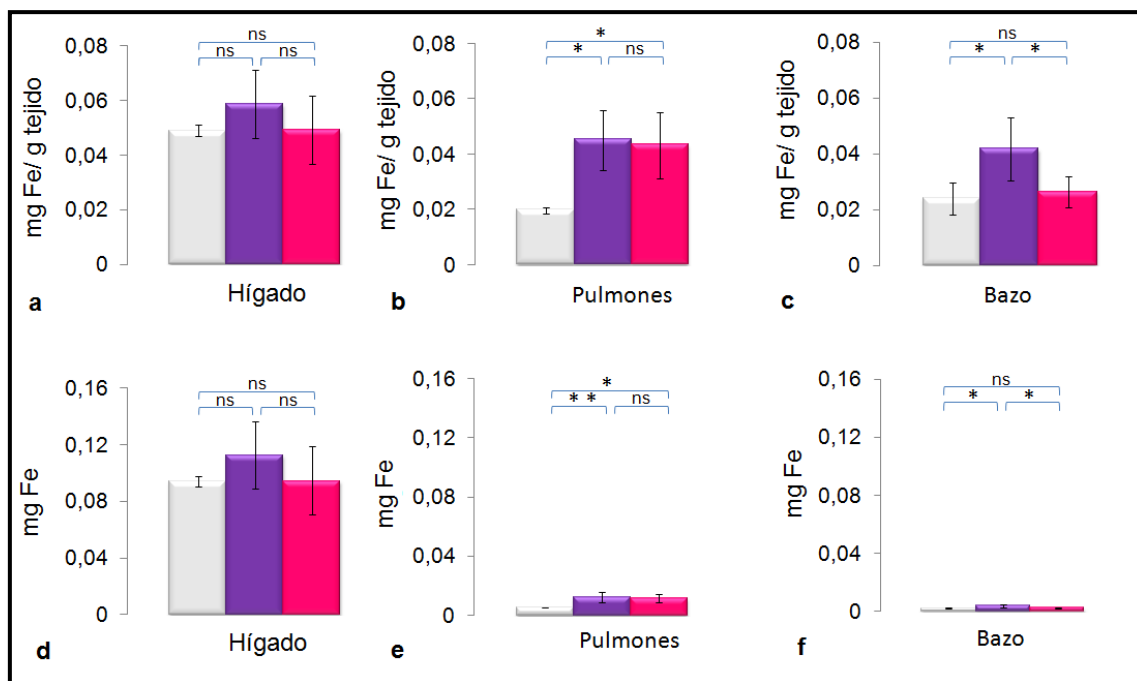


Figura 50. Detección de hierro en diferentes órganos mediante análisis elemental. A-C) Hierro detectado en diferentes fracciones de los órganos extraídos a las 3 h después de la inyección de nanopartículas. D-F) Hierro total detectado en los órganos. Control (□), NP-DMSA (■), NP-PEG-(NH₂)₂ (■). Los datos se muestran como media ±D.E. (n=4). Prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer, * p < 0,05; ** p < 0,001; NS: no existen diferencias significativas entre las muestras.

Por otra parte en los pulmones se detectó un aumento significativo de la cantidad de hierro, correspondiente a un 22% del hierro total detectado. De forma general, después de 3 horas de administradas las nanopartículas se puede detectar aproximadamente de un 15 a 30% de la dosis administrada, donde el menor valor corresponde a las NP-PEG-(NH₂)₂. Este comportamiento se halla en concordancia con el incremento del tiempo de vida media en sangre para estas nanopartículas observado anteriormente (Figura 48). El uso de esta técnica de cuantificación puede resultar muy útil para la caracterización de órganos con un bajo contenido de hierro endógeno como pueden ser los pulmones, cerebro o tejido adiposo, sin embargo falla en la detección de nanopartículas en órganos tan importantes como el hígado o el bazo (Levy et al., 2011).

6.3.3. Medidas magnéticas DC

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas han sido muy utilizadas en los estudios de detección y cuantificación de las mismas en diferentes muestras biológicas, ya sea mediante medidas relaxométricas (Weaver et al., 2013), resonancia de spin del electrón (Chaves et al., 2002), resonancia ferromagnética (Gamarra et al., 2010) o el

ultrasonido (Oh et al., 2006). En este trabajo se realizaron medidas de magnetización en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM, MLVSM9 MagLab 9 T, Oxford Instruments), de aquellos órganos más susceptibles de contener nanopartículas, como son el hígado, el bazo y los riñones, los cuales median en el metabolismo y eliminación de las nanopartículas de hierro del organismo. También se analizaron los pulmones tras haber detectado agregados de nanopartículas en este tejido mediante el estudio histológico, así como un incremento en el contenido de hierro medido por análisis elemental.

Se registraron las curvas de magnetización a temperatura ambiente después de aplicar un campo máximo de 1 T, lo cual permitió conocer el valor de la magnetización de saturación (Ms). Los datos obtenidos de las medidas de magnetización presentan la contribución de las señales correspondientes al diamagnetismo del tejido, a la presencia de iones con contribución paramagnética o a las nanopartículas magnéticas, por lo tanto se necesita hacer una corrección matemática de los datos para restar la señal paramagnética o diamagnética, y calcular la cantidad de nanopartículas presentes en el órgano. La estimación del material superparamagnético presente en cada órgano se realiza por comparación de las curvas de magnetización de cada uno de ellos con las obtenidas con muestras de nanopartículas solas (Figura 51).

El estudio se llevó a cabo empleando dos dosis diferentes (2,5 y 0,5 mg/kg de peso del animal) con el objetivo de describir el proceso de biodistribución y establecer los límites en la capacidad de detección de las nanopartículas empleando este método de cuantificación (Figura 51). Al comparar los resultados obtenidos en las etapas iniciales de administración de ambas dosis (3 a 24 h) sólo se observaron diferencias significativas en la acumulación en hígados y pulmones en el caso de las nanopartículas recubiertas con PEG vs. NP-DMSA (Figura 51 F, G). Mediante este método de cuantificación se pudo detectar en los órganos mencionados ~10% de las nanopartículas inyectadas a las 3 horas. Sin embargo a partir de 24 horas el % total de las nanopartículas detectadas en relación a lo inyectado se reduce al 2% para las de DMSA, mientras que las de PEG se mantiene en valores ~10% (Figura 52). Esto podría deberse a una degradación más rápida de las nanopartículas recubiertas con DMSA respecto a las modificadas con PEG, donde el polímero podría estar retardando este proceso (Cole et al., 2011). También se pudo observar en el ensayo que la fracción mayoritaria de nanopartículas se acumula en el hígado, seguido por los pulmones, riñones y bazo; y que la distribución de estas fracciones varía en el tiempo.

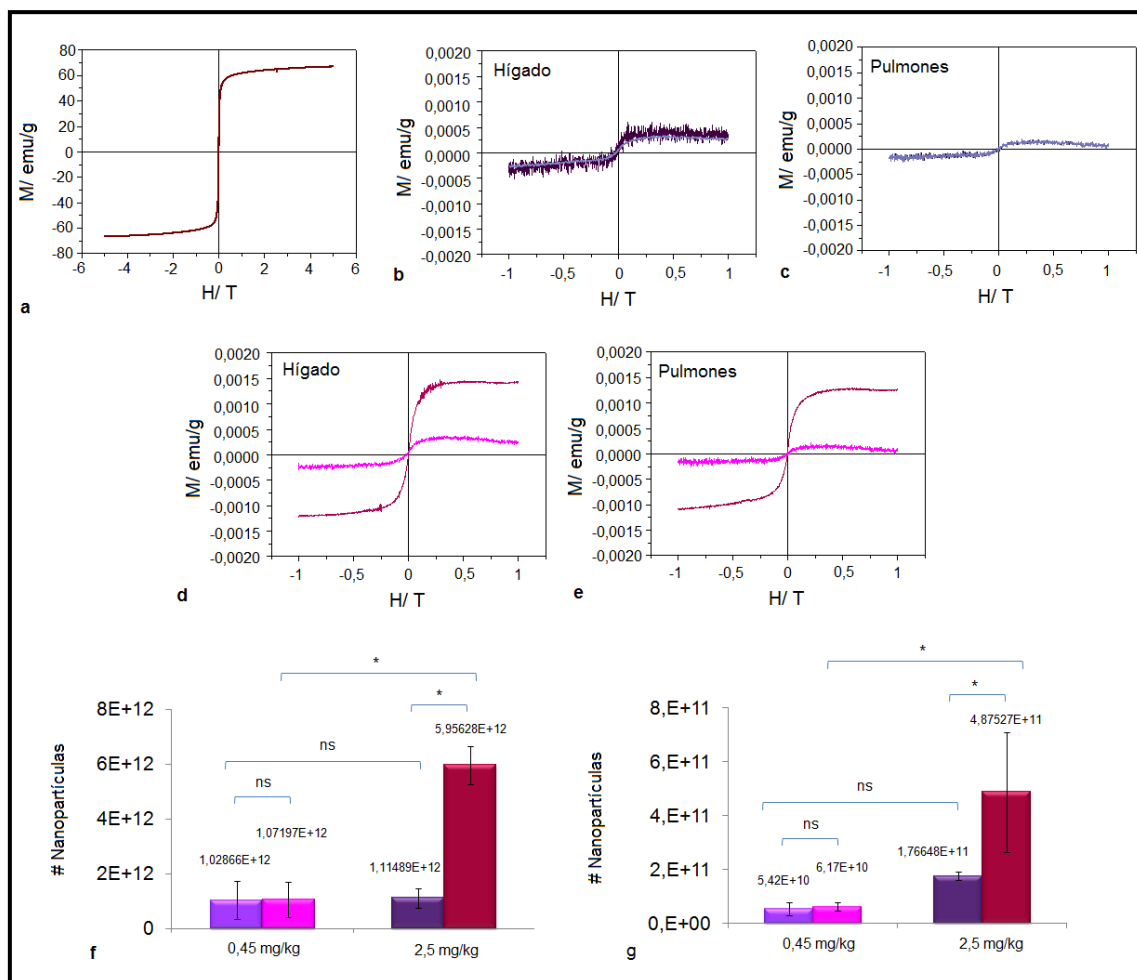


Figura 51. Detección y cuantificación de las nanopartículas magnéticas en diferentes órganos mediante medidas de magnetización. A) Curva de magnetización de una muestra patrón de las nanopartículas de 12 nm necesaria para el cálculo de la cantidad de nanopartículas presentes en cada órgano analizado (Patrón (■)). B-E) Curvas de magnetización de muestras liofilizadas de hígado y pulmones procedentes de ratas a las que se les administraron diferentes dosis de nanopartículas. F-G) Cuantificación de las nanopartículas presentes en los órganos analizados (n=4) NP-DMSA 0,45 mg/kg (■), NP-DMSA 2,5 mg/kg (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 0,45 mg/kg (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 2,5 mg/kg (■). Prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer, * p < 0,05; NS: no existen diferencias significativas entre las muestras

Estudios previos en nuestro grupo donde se han empleado ratones C57BL/6 a los que se les ha administrado NP-DMSA vía i.v. en un ensayo a dosis repetidas (9 inyecciones) hasta 2,4 mg de Fe se han podido detectar un 35% de las partículas en el hígado, 1,5% en el bazo y un 0,5% en los riñones (Mejías et al., 2010). Otros estudios donde se ha seguido la biodistribución de las nanopartículas a diferentes dosis (0,06 mg ó 2,63 mg de Fe) en ratones C57BL/6 mediante medidas de resonancia ferromagnética se ha podido detectar a las 24 horas un 49% de las partículas inyectadas en el hígado y un 5,2% en bazo. A partir de los 7 días se observa una caída en la cantidad de nanopartículas detectadas (21%), a los 30 días (2,3%) y a los 3 meses sólo un 0,25% (Levy et al., 2011).

Intentar comparar estos resultados se hace difícil, si se tiene en cuenta que se han empleado modelos animales diferentes y dosis de trabajo muy diferentes también. Probablemente en este trabajo se detecta ~10% de las nanopartículas inyectadas en las etapas iniciales del estudio y hasta un 2% en etapas más avanzadas, debido a un ritmo metabólico más intenso en ratas que en ratones. Intentar una extrapolación directa de los resultados de un modelo animal a otro puede conducir a conclusiones erróneas (Martignoni et al., 2006). Además, se debe tener en cuenta la diferencia entre las dosis utilizadas en los estudios. En este trabajo se han inyectado dosis considerablemente menores que en otros trabajos, 0.15 mg y 0.75 mg de Fe, que parecen ser degradadas rápidamente por el sistema. Podría ser que el sistema no fuera capaz de degradar dosis mayores, dando lugar a la acumulación de partículas que se detectan en los trabajos mencionados anteriormente.

Otro resultado importante que se observó en este ensayo fue una “aparente” disminución del contenido de nanopartículas en hígado y un “aparente” aumento en los pulmones, riñones y bazo si se comparan las etapas iniciales (3-24h) con el resto de los intervalos de tiempo estudiados (Figura 52). Este resultado podría ser debido a las diferencias metabólicas entre dichos órganos. Es probable que la degradación de las nanopartículas en el hígado sea mucho más rápida y activa en este órgano, donde tiene lugar de forma natural el proceso de metabolismo del hierro y su almacenamiento en forma de ferritina, comparado con un órgano como los pulmones que no presenta esta función en el organismo (Andrews, 1999). Por tanto mientras en hígado la fracción de nanopartículas detectadas disminuye, en pulmón se estaría observando un aparente aumento, pero, en realidad, se debe a un proceso de degradación más lento del material en este órgano.

También se puede observar cómo a las 3 h de administradas las nanopartículas, estas no son detectadas en los riñones, y a tiempos más avanzados en el experimento estos órganos pasan a tener una mayor importancia en el perfil de biodistribución de las nanopartículas. Estos resultados coinciden con lo observado en el estudio histológico donde sólo se detectaron resultados positivos para la tinción de Perls a partir de los 15 días de tratamiento. Estos agregados se hallaban ubicados en la zona de la corteza renal, en particular en el área correspondiente a los túbulos proximales así como en la médula renal. Dichos resultados coinciden con lo observado en primates no humanos tras la administración de nanopartículas recubiertas con DMSA (Monge-Fuentes et al., 2011). Este resultado es muy importante puesto que muestra una diferencia crucial entre ratones y ratas. En ratones no se han encontrado partículas en riñones (Levy et al., 2011; Mejías et al., 2010).

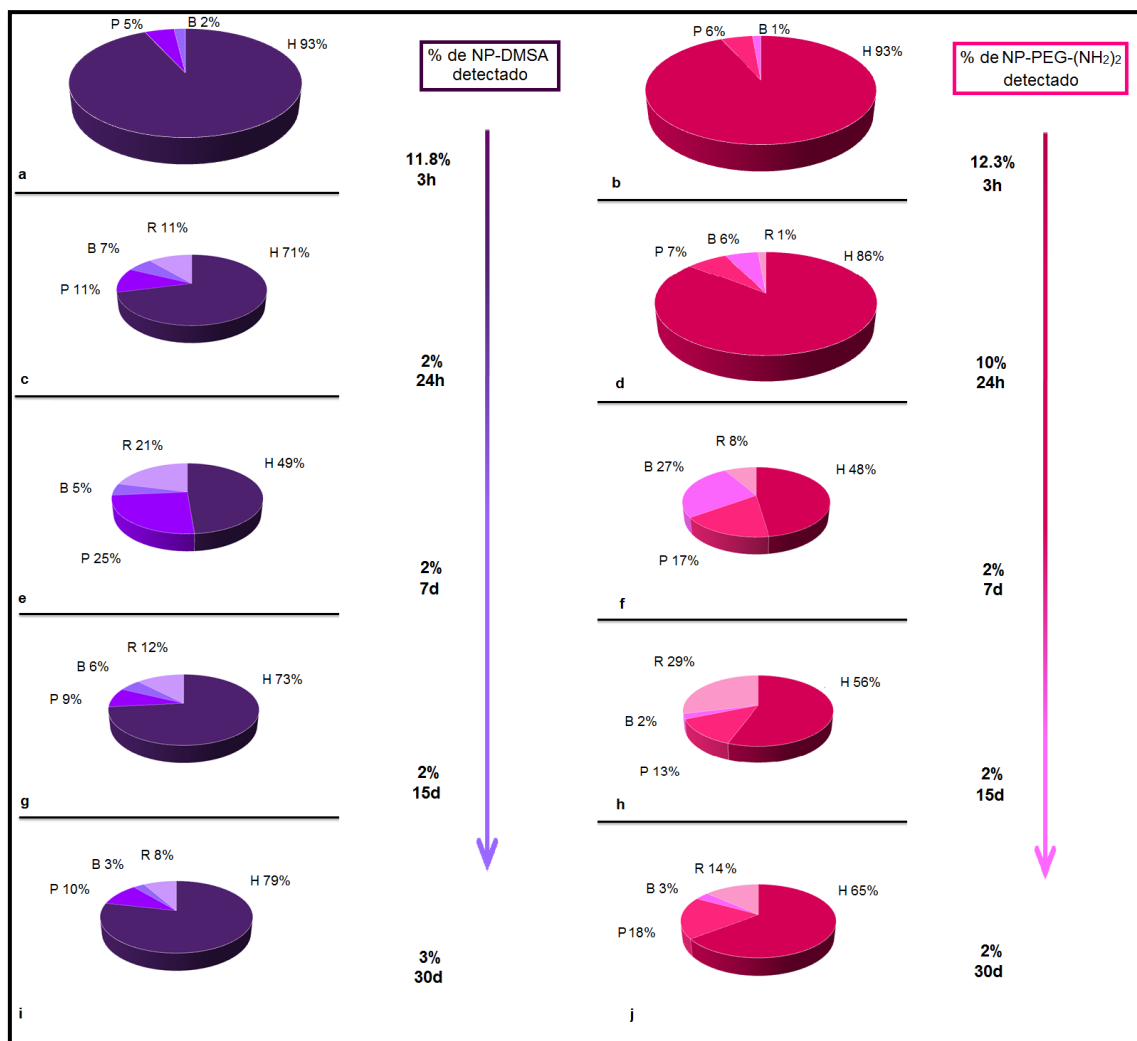


Figura 52. Análisis de las fracciones de nanopartículas detectadas mediante medidas de magnetización en los órganos colectados en diferentes intervalos de tiempo. NP-DMSA (■), NP-PEG-(NH₂)₂ (■).

6.3.4. Susceptibilidad AC

Con el objetivo de explicar las diferencias observadas entre las cantidades de nanopartículas totales detectadas a las 24h se decidió analizar muestras de hígados y pulmones correspondientes a animales tratados con cada tipo de nanopartícula mediante medidas de susceptibilidad magnética AC. Este tipo de análisis permite distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los tejidos de la respuesta generada por otros componentes magnéticos como la ferritina, ya que cada compuesto presenta su máximo de respuesta a una temperatura distinta (Lopez et al., 2007).

Las medidas se realizaron en un susceptómetro SQUID (MPMS-XL, Quantum Design). Se midió la susceptibilidad magnética AC con una frecuencia de 11 Hz y una amplitud de campo de 0.41 Oe en el rango térmico entre 5 y 300 K. Estas medidas resultan

en la obtención de dos señales: la susceptibilidad en fase (χ') y la susceptibilidad fuera de fase (χ''). En la susceptibilidad en fase, se pueden observar contribuciones a la señal correspondientes al diamagnetismo del tejido, a la presencia de iones con contribución paramagnética o a las partículas magnéticas. En la susceptibilidad fuera de fase sólo se observa la contribución correspondiente a las partículas en forma de un máximo a una determinada temperatura, que está relacionada con procesos de relajación magnética. El máximo en la susceptibilidad fuera de fase se corresponde con otro máximo que se observa en la susceptibilidad en fase a temperaturas ligeramente superiores (Figura 53).

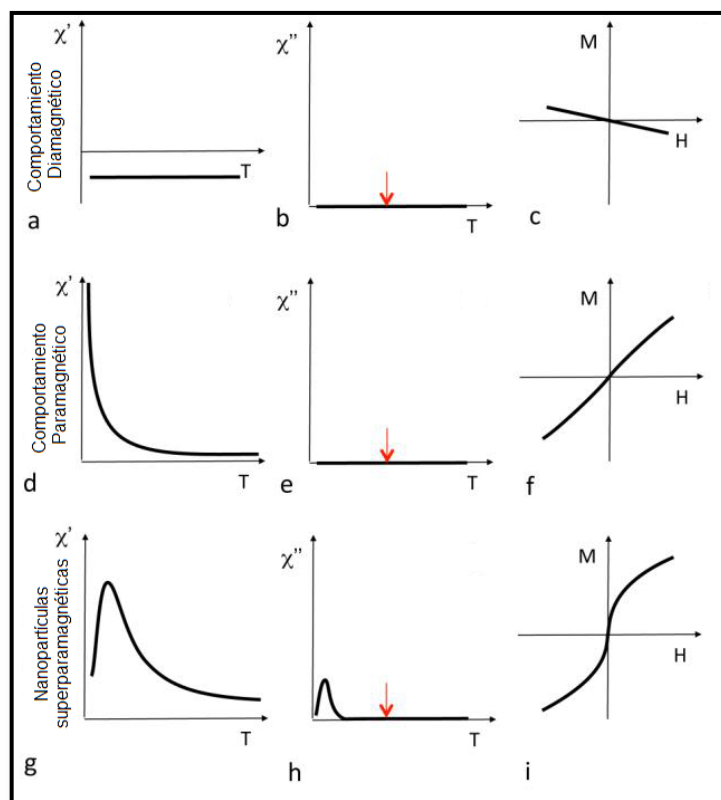


Figura 53. Esquema cualitativo de las señales típicas obtenidas en tejidos biológicos después de un tratamiento con nanopartículas magnéticas en función de la temperatura. Primera columna: Susceptibilidad en fase. Segunda columna: Susceptibilidad fuera de fase. Tercera columna: Medidas de magnetización realizadas a la temperatura que indican las flechas rojas. (Adaptado de (Gutiérrez et al., 2013)).

En tejidos en los que hay acumulación de hierro se suele observar un máximo en χ'' en torno a 10-20 K correspondiente a la presencia ferritina (o al menos el núcleo biomineral de la proteína). Las partículas magnéticas inyectadas suelen tener un máximo entre 50 y 150 K, lo que permite diferenciarlas de la ferritina. En la Figura 54A-B se observa el máximo en la susceptibilidad en fase a aproximadamente 150 K y otro máximo en la susceptibilidad fuera de fase a aproximadamente a 75 K para las partículas modificadas con PEG. No obstante, la posición del máximo de las partículas magnéticas

puede variar en función de la agregación de las partículas, que puede afectar a la presencia de interacciones dipolares, o posibles procesos de degradación que alteren el tamaño de las partículas (Lopez et al., 2007). Las partículas modificadas con DMSA presentan un máximo a 10-20 K en ambas susceptibilidades.

En las medidas de susceptibilidad realizadas en tejidos, el pico de la susceptibilidad en fase y fuera de fase indica la presencia a las 24h de partículas magnéticas en hígados y pulmones de animales a los que se les administraron NP recubiertas con PEG. Sin embargo, no se observó la presencia de nanopartículas en estos órganos de los animales a los que se les administraron partículas recubiertas con DMSA. En este caso sólo se observa un pico a más baja temperatura que se corresponde con la presencia de ferritina en el hígado. En el caso de los pulmones se observa una contribución paramagnética en la susceptibilidad en fase (subida exponencial de la señal a baja temperatura) típica de iones hierro (Figura 54).

El hecho de que la señal magnética se corresponda a ferritina en el hígado de las ratas tratadas con NP-DMSA (24h), mientras que en las ratas tratadas con NP-PEG-(NH₂)₂ (24h) se puede distinguir claramente la señal correspondiente a las nanopartículas y a la ferritina, corrobora el hecho de que este polímero contribuye a retardar el proceso de degradación de las nanopartículas. Al cabo de 30 días se observa cómo la señal de las NP-PEG-(NH₂)₂ ha desaparecido y en hígado sólo se observa la señal correspondiente a la ferritina mientras que en los pulmones aparece una señal paramagnética característica del hierro en forma de iones.

Las medidas de susceptibilidad AC, además de ser más sensibles que las curvas de imanación, permiten diferenciar entre especies de Fe presentes en los órganos y tejidos, por lo que es posible hacer un seguimiento de la degradación de las partículas desde su disolución hasta su transformación en ferritina o transporte en forma de iones Fe. Esto es debido por una parte a que la señal de las distintas especies está diferenciada en temperatura, por lo que la respuesta no es necesario corregirla como en el caso de las curvas de imanación, y por otra parte la señal procedente de magnetita es mucho mayor que la señal de la ferritina, aunque esta última esté en mayor concentración. Finalmente, es importante apuntar que la susceptibilidad AC permite cuantificar las partículas por órgano o tejido utilizando los patrones adecuados. Esto permitirá en un futuro saber la eficacia en la administración de partículas cuando sean adecuadamente funcionalizadas para dirigirlas a un determinado sitio o bien con la ayuda de un imán.

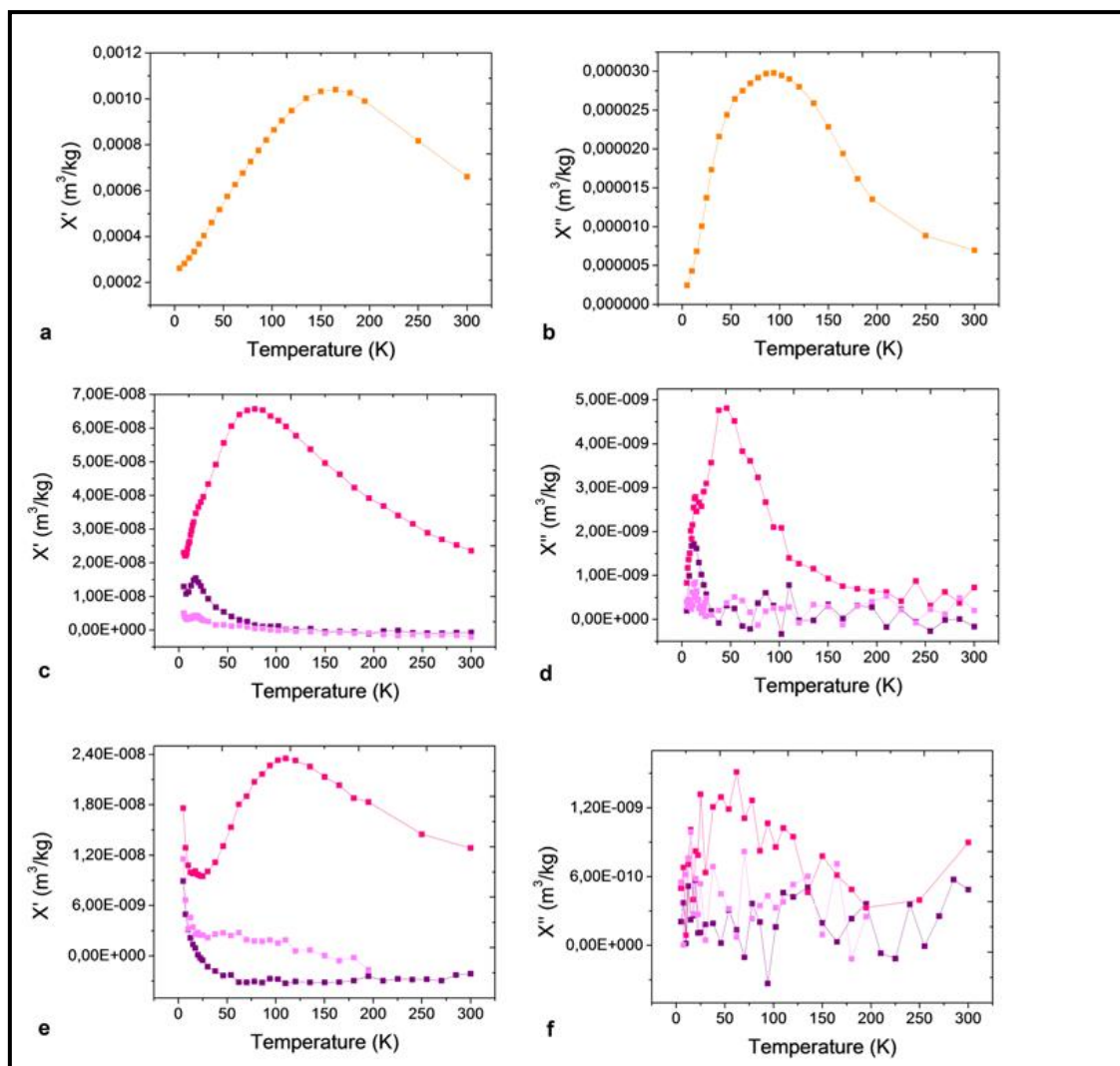


Figura 54. Susceptibilidad magnética a diferentes temperaturas de muestras liofilizadas de hígados y pulmones extraídos tras la administración de nanopartículas magnéticas. A-B) Control de NP-PEG-(NH₂)₂ (■), C-D) Muestras de hígado, E-F) Muestras de pulmón. NP-DMSA 24 h (■), NP-PEG-(NH₂)₂ 24 h (■) y NP-PEG-(NH₂)₂ 30 días (■).

6.3.5. Análisis *in vivo* por Resonancia Magnética Nuclear

Las imágenes de resonancia magnética son esenciales para estudiar de modo no invasivo el proceso de biodistribución de las nanopartículas magnéticas. El elevado contraste que ofrecen las nanopartículas y la alta resolución temporal y espacial de este método avalan la utilización de esta técnica en la clínica, la preclínica, la industria y las investigaciones biomédicas (Cabal et al., 2009). Otra ventaja en la utilización de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como agente de contraste es su baja toxicidad. La cantidad total de óxido de hierro que se utiliza en la clínica para el diagnóstico por MRI (50-200 mg Fe, 0,7-2,8 mg/kg (70 kg)) es pequeño en comparación

con la cantidad de hierro total presente en el organismo. La toxicidad crónica se desarrolla sólo después de que el hierro en el hígado excede una concentración de 4 mg Fe /g de tejido (Rodríguez et al., 2008). En nuestro caso, mediante medidas magnéticas se pudo cuantificar que a las 24 horas de administradas las NP-PEG-(NH₂)₂ se acumulaban en este órgano ~5,9E+12 partículas, lo cual se corresponde con 0,04 mg Fe/ g de tejido.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de las propiedades relaxométricas de las nanopartículas, se decidió evaluar *in vivo* las NP-PEG-(NH₂)₂ como agentes de contraste. Las imágenes fueron obtenidas en un equipo Symphony 1,5 T clase maestro de Siemens. Numerosas publicaciones refieren el uso de los equipos clínicos de Imágenes de Resonancia Magnética para el estudio de modelos animales y la evaluación de la acción de fármacos (Inderbitzin et al., 2007). Las secuencias de pulso empleadas fueron T2 Turbo Spin Eco (TSE) con un Tiempo de Eco (TE) de 64 ms y Tiempo de Repetición (TR) de 4000 ms. La secuencia T1 VIBE también escaneada con TE=4 ms y TR=11.3 ms. Se empleó una bobina de radiofrecuencia Flex S lo cual permitió realizar evaluaciones y comparaciones, al menos semicuantitativas, entre diferentes animales y a lo largo del tiempo (Ruiz et al., 2013a).

En la Figura 55B se muestra un esquema de cómo debe ser el comportamiento de la concentración de las nanopartículas a través del tiempo. En el eje de las ordenadas se representa el inverso de la intensidad de la imagen de resonancia normalizada, que es proporcional a la concentración de las nanopartículas en un instante dado. En las abscisas se representa el tiempo a partir del instante en que se le suministran las nanopartículas a la rata a través del torrente sanguíneo (vía intravenosa). La curva presenta tres regiones que corresponden a la entrada de las nanopartículas en el hígado (proceso de absorción), el tiempo de residencia y el proceso de eliminación (excreción) en este órgano. La velocidad de variación de la concentración de las nanopartículas en todas las etapas se puede determinar a partir de las pendientes de cada una de las regiones y se pueden establecer los tiempos de inicio de la residencia (tR_0) y de inicio de la excreción (tE). El tiempo de residencia será $tR=tR_0-tE$.

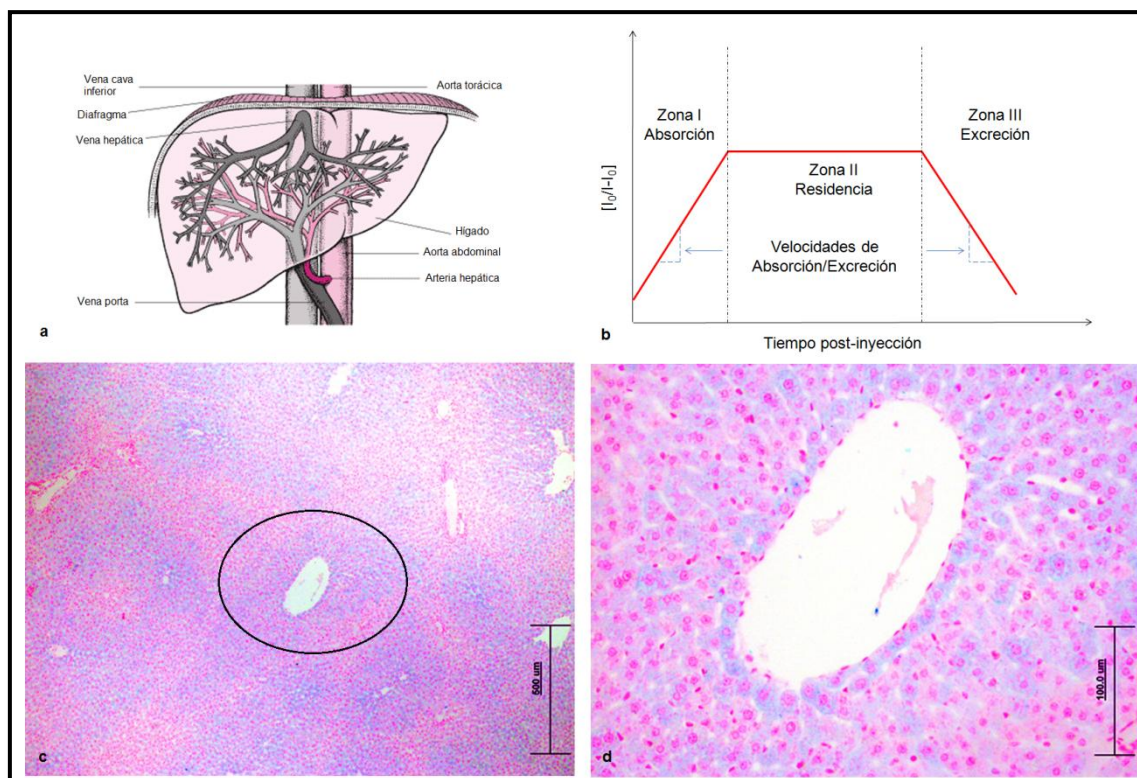


Figura 55. A) esquema de la circulación hepática. B) Esquema de la dependencia temporal de la concentración de nanopartículas en el hígado. Se evidencian tres regiones que se corresponden con los procesos de absorción, residencia y excreción de las nanopartículas. Las pendientes de la curva en estas regiones son proporcionales a las velocidades con que ocurren los procesos. Los puntos de inflexión marcan los momentos iniciales de las etapas II y III. C-D) Detección mediante tinción de Perls de las nanopartículas magnéticas acumuladas en los hepatocitos alrededor de las venas centro lobulares hepáticas.

Se obtuvieron imágenes del hígado de las ratas (control) antes de suministrárseles las nanopartículas NP-PEG-(NH₂)₂ (dosis: 0,8 y 5 mg/kg de peso), lo cual sirvió de referencia para todas las mediciones de intensidad de las imágenes en este órgano. Además se tomó como valor de referencia la intensidad de la imagen en el tejido muscular. En la Figura 56 se muestran las imágenes axiales del hígado antes (Figura 56A) y después de administradas las nanopartículas (dosis: 5 mg/kg) a diferentes intervalos de tiempo (30 min, 288 h (12 días) y 528 h (22 días)). Este ensayo permitió corroborar lo observado mediante el estudio histológico, donde se observó que no existen alteraciones morfológicas en los órganos debido a la presencia de las nanopartículas (Figura 55 C-D).

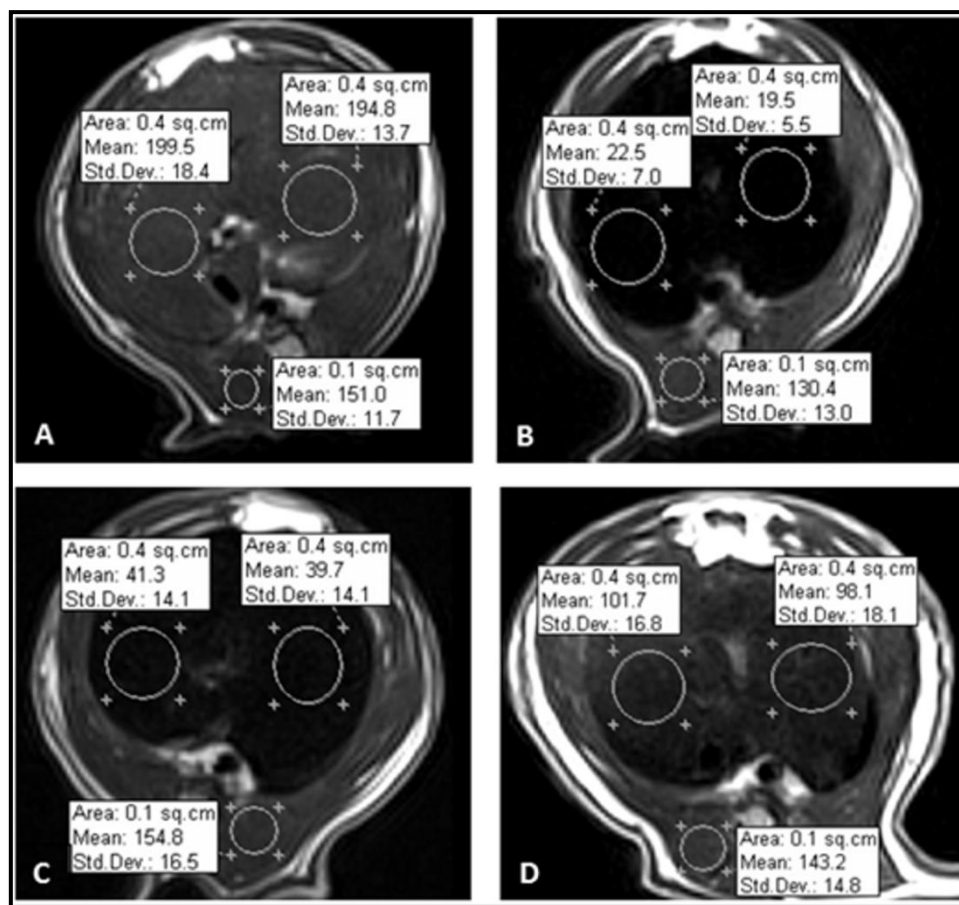


Figura 56. Imágenes de resonancia T2 del hígado a diferentes intervalos de tiempo después de administradas las NP-PEG-(NH₂)₂ (5 mg/kg): t = 0 (A), t = 30 min (B), t = 288 h (C), y t = 528 h (D).

En la Figura 57 se muestran los resultados experimentales de la medición del inverso de la intensidad en las imágenes de resonancia en función del tiempo para dos zonas (curvas en rojo y azul), de igual área, del hígado. Se delimitan las tres regiones mencionadas en la Figura 55B. La región I con pendiente positiva se puede identificar como el periodo de entrada y absorción de las nanopartículas. La región II cuya pendiente es ~ 0 se corresponde con el tiempo de instauración y residencia de las nanopartículas en este órgano. Finalmente la región III de pendiente negativa, donde comienza la disminución de la intensidad de la imagen puede relacionarse con la etapa de degradación y excreción de las nanopartículas en este órgano. Por otra parte en la curva malva se grafican los valores del inverso de la intensidad normalizada para el tejido muscular lo cual es un control muy utilizado en la literatura. Como era de esperar no existen variaciones en la intensidad de la imagen correspondiente al tejido muscular a lo largo de todo el proceso de estudio (528 horas).

Al inicio de la región II (etapa de residencia) se observa, desde 12 minutos a una hora, una tendencia a presentar un máximo con valores fluctuantes. Esto podría ser

debido a los procesos hemodinámicos del hígado donde en momentos tempranos existe una entrada de las nanopartículas a través del abundante torrente sanguíneo, y una parte de estas comienza a instaurarse en los espacios intersticiales de los hepatocitos y otra cantidad aún se mantiene en el espacio intravascular y son eliminadas por el árbol vascular de retorno. El equilibrio entre ambos procesos pudiera ser la causa del ligero máximo observado en todas las curvas cinéticas. Este proceso de instauración progresiva de las nanopartículas en el parénquima hepático se puede corroborar mediante el análisis histológico de este órgano, donde se observa que la ubicación de las nanopartículas es más concentrada alrededor de las venas centrolobulares y se distribuyen radialmente en el parénquima hepático (Figura 55 C-D).

Los valores de las velocidades de absorción, de residencia y de excreción así como los tiempos de inicio de la residencia y de la excreción determinados a partir de las curvas de la Figura 57A se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de los valores correspondientes a la absorción, residencia y excreción de las nanopartículas en el hígado.

| Parámetros | Zona 1 | Zona 2 |
|------------------------------------|--------|--------|
| Tiempo de inicio de residencia (h) | 0,2 | 0,2 |
| Tiempo de inicio de excreción (h) | 1,7E+2 | 1,7E+2 |
| Velocidad de absorción (U. A) | 35 | 34 |
| Velocidad de excreción (U. A.) | 1,9E-2 | 1,3E-2 |
| Tiempo de residencia (h) | 1,6E+2 | 1,6E+2 |

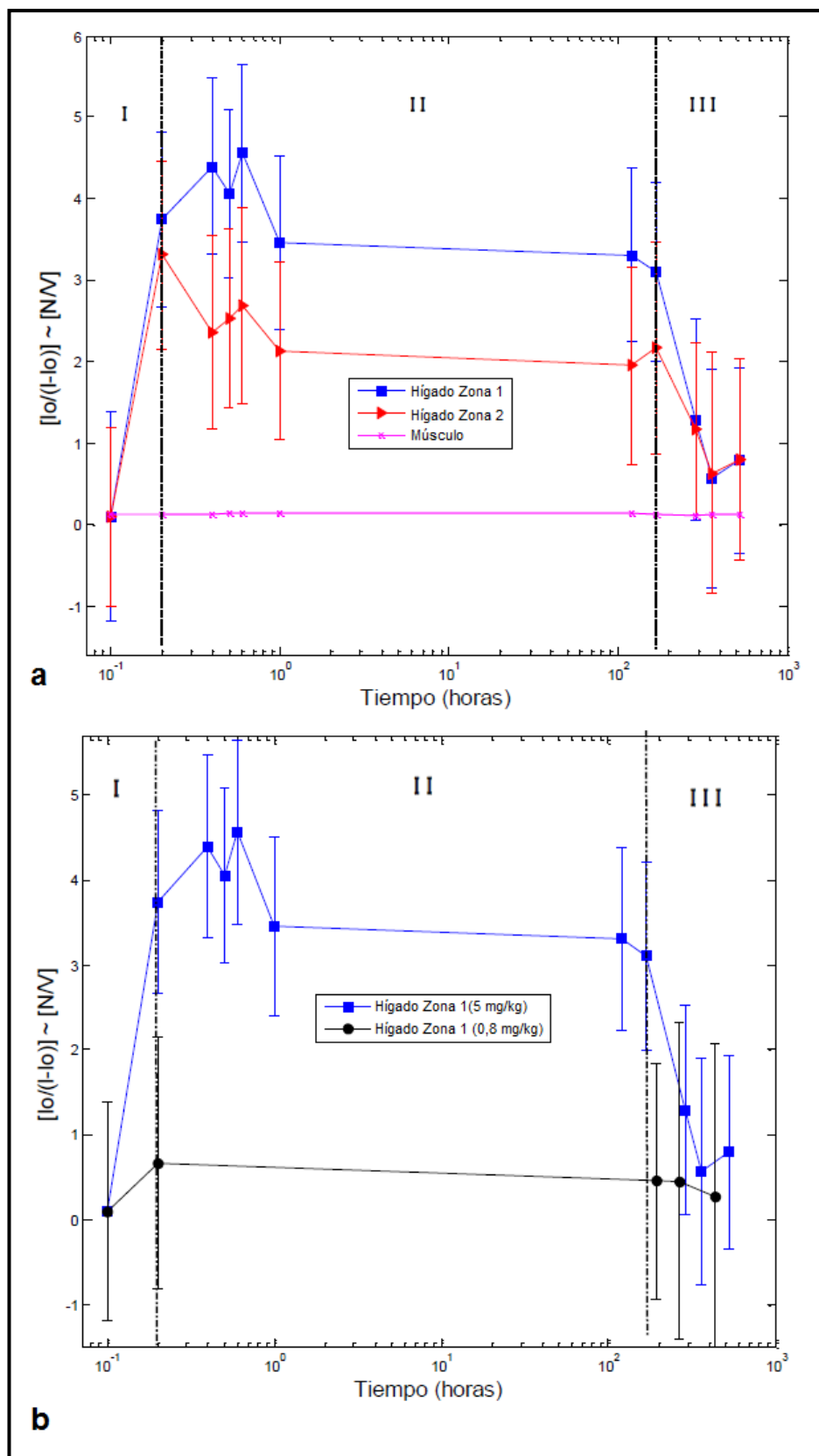


Figura 57. Dependencia temporal de la intensidad de la imagen T₂ determinada por la relación $I_0/(I-I_0)$ (n=4). A) Las curvas roja y azul se refieren a la concentración de la nanopartículas en dos zonas (1 y 2) de igual área del hígado. La curva malva refleja la intensidad de la imagen en el área de tejido muscular. B) Curvas cinéticas para dos concentraciones de nanopartículas (azul: 5 mg/kg, negra: 0,8 mg/kg).

En la Figura 57B se muestra el comportamiento temporal de la intensidad de la imagen T2 para dos concentraciones de nanopartículas diferentes. Se puede observar que en ambos casos se conservan las mismas regiones I, II y III. La curva negra corresponde a una concentración de 0,8 mg/kg y la azul a 5 mg/kg. La razón de las concentraciones nominales es de 6,5 veces y la relación de las concentraciones medidas a partir de la razón de las curvas azul y negra en la región II (de residencia) es de 5,8 veces. Ambas razones se diferencian en un 11%. Esta diferencia pudiera atribuirse tanto a errores del proceso de aplicación intravenosa de las nanopartículas, o de medición de las intensidades en la imagen o a la suma de errores experimentales en ambos procesos.

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran la instauración homogénea de las nanopartículas en diferentes zonas del hígado, así como un periodo de residencia estable de hasta 12 días. Estos datos confirman lo observado mediante medidas de magnetización o histología. Además ha permitido establecer el perfil cinético de las nanopartículas en dicho órgano lo cual constituye una herramienta de trabajo para futuros estudios de la acción de drogas conjugadas a nanopartículas magnéticas.

6.4. Metabolismo del hierro

El hierro es reconocido como un elemento indispensable para la vida, aunque su presencia cuantitativa en los tejidos biológicos pueda ser clasificada a nivel de trazas. En el organismo de los mamíferos, el hierro es generalmente el metal de transición más abundante. En su mayoría se encuentra presente como un compuesto metalo-orgánico (hemoproteínas) o en el núcleo de proteínas como la ferritina (Gutierrez et al., 2006). Su función en los procesos metabólicos, está relacionada con su capacidad de aceptar o donar electrones a través de su interconversión entre las formas férricas (Fe^{3+}) y ferrosas (Fe^{2+}). Este tipo de reacciones, necesarias para un metabolismo celular normal, no son inocuas para la integridad de las células ya que producen radicales libres de oxígeno, los cuales dañan las membranas, las proteínas y los ácidos nucleicos. Una primera consecuencia de este hecho fisiológico es que su transporte, transmisión y almacenamiento en las células tiene lugar con el átomo enclaustrado en proteínas, que lo solubilizan y evitan el daño tisular (Figura 58). Su distribución entre las diferentes moléculas es la siguiente: Hierro funcional o “activo” (80 % del total), la mayoría del cual se encuentra unido al grupo hemo de la hemoglobina (65%), de la mioglobina (10%) y un 5% a enzimas como catalasas, peroxidasas y citocromos. Hierro de transporte, que se

corresponde al incorporado a las moléculas de transferrina, y que supone una fracción mínima del total (0,1-0,2%). Hierro de depósito o de reserva, en forma de ferritina y hemosiderina (J.J. Alonso, 2002).

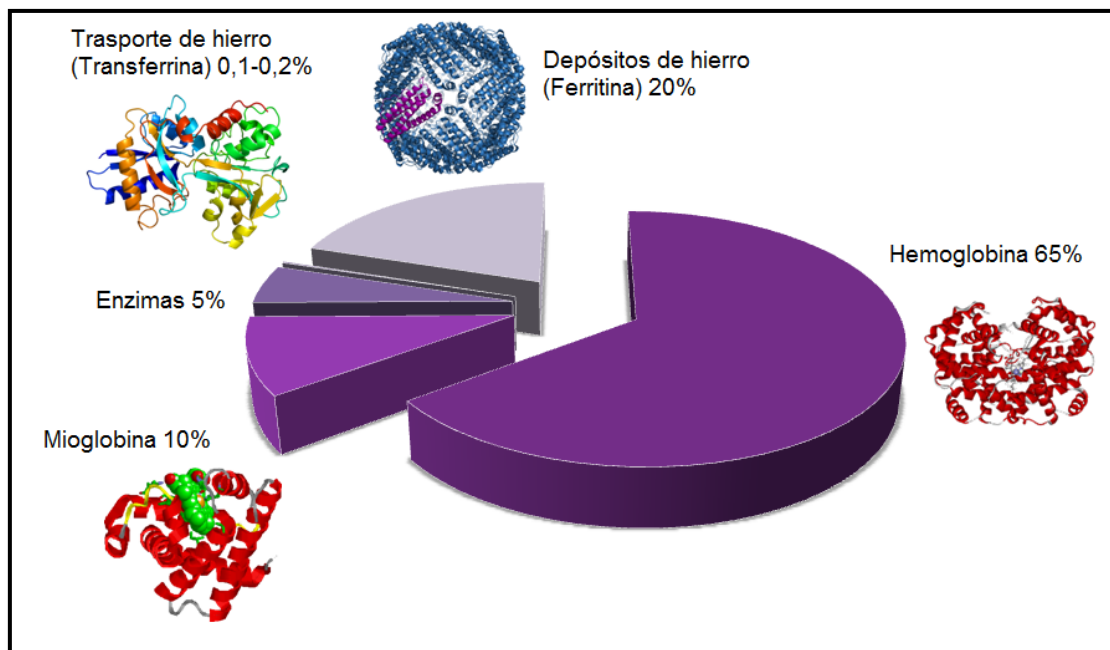


Figura 58. Distribución del hierro en el organismo.

La homeostasia del hierro en el organismo es un proceso metabólico estrictamente controlado. En el plasma y espacio intersticial el hierro es transportado por la transferrina, proteína de 80 kDa, de síntesis hepática, con capacidad de transporte de dos átomos de hierro, uno en cada lóbulo, en su forma férrica. La captación celular del hierro circulante requiere la unión de transferrina al receptor de transferrina. Estos complejos se agrupan en la membrana celular en depresiones revestidas de clatrina, que se internalizan en la célula vía endocitosis. Una bomba de protones acidifica el contenido del endosoma, facilitando la liberación de los átomos de hierro, que atravesarán la membrana vesicular, en su forma ferrosa, por intervención de DMT-1, que es un transportador de metales divalentes. En el citoplasma se incorporará a diferentes rutas metabólicas, como la síntesis del hemo en las mitocondrias, como parte de los grupos hierro-azufre de proteínas del ciclo de Krebs, o será almacenado como ferritina (J.J. Alonso, 2002). El hierro ferroso también puede ser exportado al exterior celular a través de una proteína transportadora llamada Ferroportina. Debido a su potencial efecto tóxico este hierro será rápidamente reconocido por dos proteínas de la matriz extracelular (Ceruloplasmina y Hefestina) que lo transformarán nuevamente a su forma oxidada. El Fe^{3+} es reconocido por la apo-

transferrina que se convierte a transferrina y es la que realiza el transporte del hierro en la sangre hasta los órganos donde se requiera (Andrews, 1999).

Con el objetivo de estudiar la influencia de la administración de nanopartículas de óxido de hierro en ratas Wistar sobre el metabolismo del hierro, se seleccionaron 3 proteínas claves de esta ruta metabólica: DMT-1, Ferroportina y Ferritina. En este trabajo se cuantificó mediante la técnica de ELISA el contenido de dichas proteínas en diferentes órganos que median en el proceso metabólico del hierro (Hígado, bazo y riñones) (Figura 59).

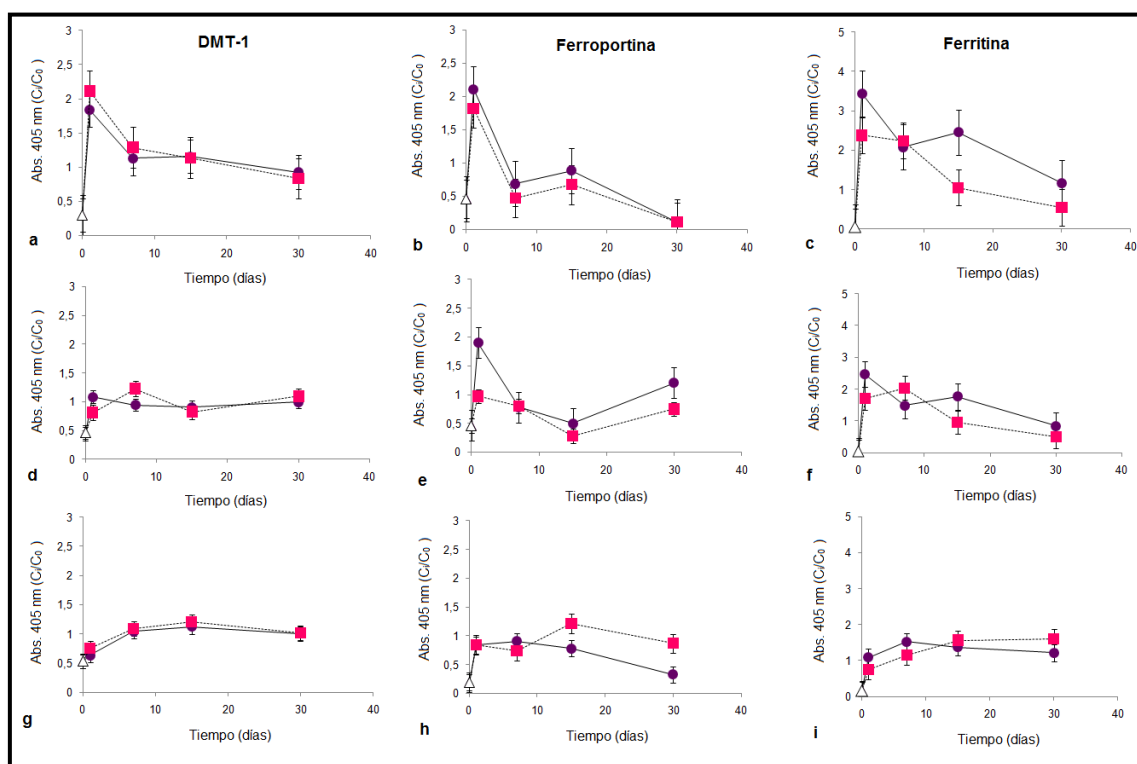


Figura 59. Cuantificación por ELISA de diferentes proteínas involucradas en el metabolismo del hierro en ratas Wistar después de la administración de las nanopartículas (dosis: 2,5 mg/kg) (n=4). La primera columna muestra los resultados obtenidos para DMT-1, la columna central para Ferroportina y la tercera columna para Ferritina. A-C) Hígado, D-F) Bazo y G-I) Riñones. NP-DMSA (●), NP-PEG-(NH₂)₂ (■).

Después de la administración de las nanopartículas en ratas Wistar (dosis: 2,5 mg/kg, n=4) se sacrificaron los animales y se colectaron fragmentos del hígado, bazo y riñones los cuales fueron homogeneizados y extraídas las proteínas del tejido. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry y a partir de estos datos e prepararon diluciones de 1 mg/mL de concentración final de proteína total. Las placas de ELISA fueron tapizadas en cada caso con diferentes anticuerpos monoclonales específicos para el reconocimiento de las isoformas de rata de DMT-1,

Ferroportina y Ferritina y se añadieron 80 μ L de las diluciones previamente preparadas de los homogenados de tejidos. Después de los tiempos de incubación y lavados que se describen en la sección de materiales y métodos, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a peroxidasa y se reveló la placa mediante la adición del sustrato OPD.

En la Figura 59 se observa la variación en el tiempo (24 h, 7 días, 15 días y 30 días) de la concentración de dichas proteínas con respecto a la concentración basal de las mismas obtenidas del grupo control (animales no tratados). De forma general se puede observar que en los diferentes órganos hay un marcado incremento de la concentración de proteínas hasta 24 horas después de administradas las nanopartículas, probablemente debido a una rápida activación de la ruta metabólica para intentar mantener la homeostasia del hierro en el organismo. A partir de los 7 días se observa como la concentración de estas proteínas va disminuyendo con una tendencia a regresar a los valores basales a los 30 días aproximadamente. Esta tendencia a la disminución en los diferentes órganos puede deberse a que en el citoplasma de las células existen proteínas reguladoras del hierro (IRP-1 e IRP-2) que en condiciones de exceso de hierro, bloquean la síntesis de DMT-1, ferroportina y del receptor de transferrina, mientras que activan la producción de ferritina. La concentración de ferritina se mantiene elevada sobre los niveles basales durante más tiempo con el objetivo de almacenar el exceso de hierro presente en el organismo (Andrews, 1999). El incremento de la cantidad de ferritina presente en el hígado detectado por ELISA confirma los resultados obtenidos en las medidas de susceptibilidad AC.

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten describir de forma general el proceso de biodistribución de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG en un modelo animal de ratas Wistar. Las nanopartículas administradas de forma intravenosa, a través de la vena de la cola, se mantienen en el torrente sanguíneo aproximadamente 10 minutos para las NP-DMSA y ~ 1 h para NP-PEG-(NH₂)₂. Estas se acumulan en órganos bien irrigados y ricos en macrófagos como el hígado, los pulmones y el bazo. El proceso de opsonización de las nanopartículas, así como su reconocimiento por las células del sistema retículo endotelial se halla descrito como el mecanismo mediante el cual las nanopartículas son eliminadas del torrente sanguíneo (Kommareddy and Amiji, 2007). Este proceso ocurre rápidamente ya que los macrófagos son capaces de internalizar solutos y partículas equivalentes a su volumen celular cada 2 horas (Steinman et al., 1976). Las nanopartículas son incorporadas a la célula vía endocitosis y se ubican en compartimentos ácidos donde comienza su proceso de degradación, así como la activación de la ruta metabólica del hierro. Las proteínas DMT-1 y ferrireductasa median en el proceso de liberación del hierro al citosol, el cual puede

seguir diferentes vías: incorporación a proteínas mitocondriales con grupos hierro-azufre, síntesis del hemo, almacenamiento en complejo con ferritina o ser exportado al exterior celular. Al ser exportado a la matriz extracelular en su forma ferrosa es rápidamente reconocido por dos proteínas (Ceruloplasmina y Hefestina) que lo oxidan para evitar la generación de radicales libres, y daños en membranas celulares y proteínas. Este Fe^{3+} es reconocido por la apo-transferrina, que se activa a transferrina y es la proteína encargada de su transporte hasta la médula ósea (función hematopoyética) o para su almacenamiento en el hígado (Ruiz et al., 2013a). El esquema se representa en la Figura 60.

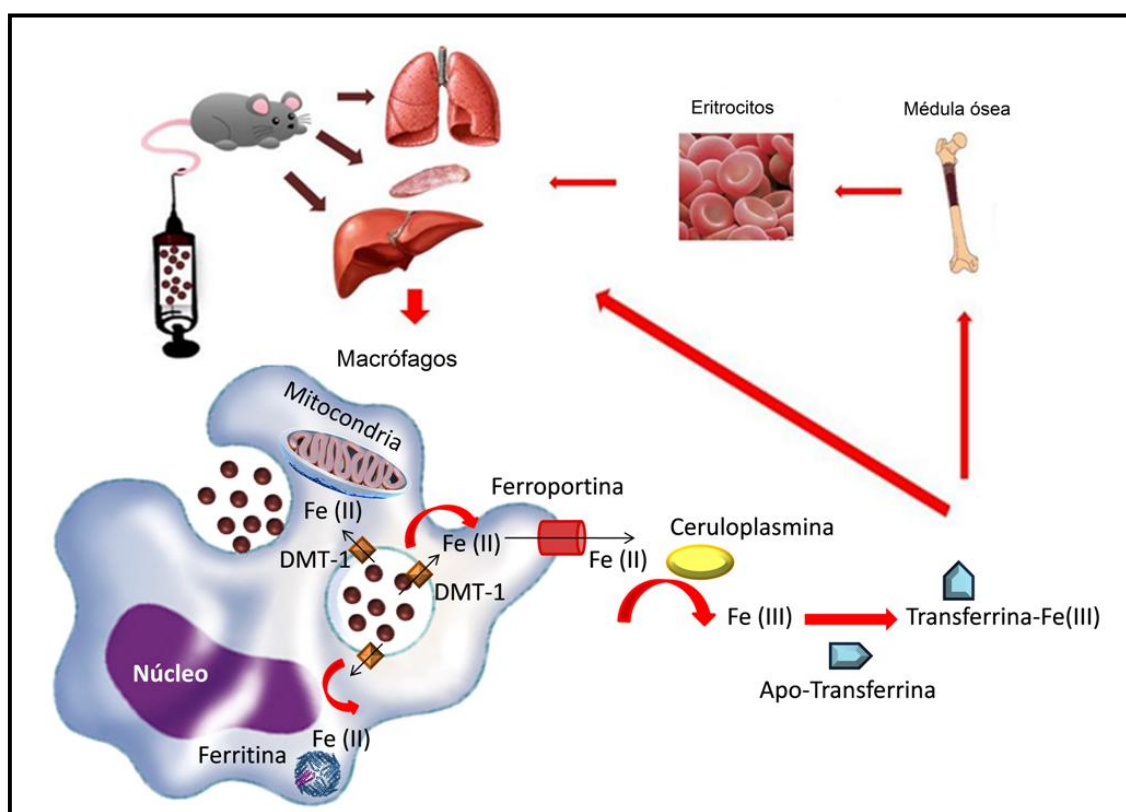


Figura 60. Representación esquemática de las diferentes vías que pueden seguir las nanopartículas de óxido de hierro después de su inyección intravenosa.

Capítulo 7. Conclusiones



Capítulo 7. Conclusiones

La síntesis de nanopartículas de óxido de hierro empleando diferentes métodos de preparación (Coprecipitación y Descomposición térmica en medio orgánico) ha permitido el desarrollo de una *plataforma basada en nanopartículas magnéticas para diferentes aplicaciones biotecnológicas*.

A continuación se presentan las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo de tesis:

- i) La síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro vía coprecipitación, y su posterior modificación superficial con la agarosa, ha permitido su aplicación como soporte para la inmovilización de proteínas de fusión que contienen como etiqueta de afinidad un dominio tipo lectina. Este constituye un método viable para la detección y purificación de proteínas recombinantes fusionadas al módulo lectina de la proteína hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus*. La interacción con la proteína de fusión tiene un carácter bioespecífico, dirigido espacialmente, reversible y accesible al corte con proteasas. Además, al conjugar enzimas al módulo lectina de LSL es posible mantener la actividad enzimática de las mismas sobre el soporte magnético y posteriormente recuperar la proteína manteniendo su actividad biológica.
- ii) La síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro por descomposición en medio orgánico ha permitido la obtención de partículas de 7, 10 y 12 nm respectivamente, con un estricto control del tamaño y forma de partícula. Las partículas presentan un comportamiento superparamagnético y elevados valores de magnetización de saturación cercanos al del material masivo. Mediante el intercambio de ligandos con DMSA y la posterior unión covalente del PEG derivatizado con grupos amino en el terminal de la cadena, a través de una reacción mediada por carbodiimida, se han podido obtener suspensiones de nanopartículas estables en agua con diámetros hidrodinámicos menores de 100 nm apropiadas para aplicaciones biomédicas.
- iii) Las medidas de los valores de relajividad del protón muestran que estas suspensiones poseen un futuro prometedor como agentes de contraste en

Resonancia Magnética Nuclear debido a sus elevados valores de relaxividad transversal (r_2) similares o mayores que los de los agentes de contraste comerciales.

- iv) Las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG pueden ser empleadas como una plataforma para la administración de fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades. Es posible su funcionalización con dos péptidos: CIGB300 y CIGB500 con vistas al tratamiento de diferentes enfermedades.
- v) Debido a las diferencias en la carga superficial de las nanopartículas recubiertas con DMSA y las partículas modificadas con PEG existen diferencias en el proceso de interacción célula partícula. Las partículas magnéticas recubiertas de DMSA se internalizan dentro de células vía endocitosis tras 24 horas de incubación, mientras que las partículas conjugadas a PEG permanecen adheridas a la membrana citoplasmática. Las partículas no resultan tóxicas para las células en un rango de concentraciones hasta 0,3 mg Fe/mL en el medio de cultivo.
- vi) Las nanopartículas recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG afectan la vía de coagulación intrínseca de la sangre medido *in vitro* como el tiempo de tromboplastina parcial activada. Sin embargo no existen afectaciones en la eficacia de la vía de coagulación extrínseca o el resto de los parámetros hematológicos estudiados *in vitro* e *in vivo*. No existe daño genotóxico asociado al tratamiento con las nanopartículas a las dosis ensayadas.
- vii) La conjugación a PEG modifica el perfil farmacocinético de las nanopartículas aumentando el tiempo de residencia en sangre en diferentes modelos animales.
- viii) Mediante la combinación de métodos magnéticos y no magnéticos se pudo estudiar la biodistribución de las nanopartículas en un modelo animal de ratas Wistar. Las nanopartículas se localizan en el hígado, pulmones y bazo en etapas tempranas después de la administración (hasta 24 h) y a más largo plazo en riñones. Las nanopartículas recubiertas con DMSA se degradan a ferritina a partir de 24 h, mientras que las nanopartículas modificadas con PEG se pueden detectar hasta 30 días después de su administración en el hígado, mediante medidas de imanación e imagen por Resonancia Magnética Nuclear.
- ix) La administración de las nanopartículas en ratas Wistar aumenta la concentración de diferentes proteínas involucradas en la ruta metabólica del

hierro (DMT-1, Ferroportina y Ferritina) en hígado, bazo y riñones en etapas tempranas después de la administración, en las primeras 24 horas. Posteriormente los valores de concentración de estas proteínas en los tejidos mantienen una tendencia decreciente retornando a los valores basales en 30 días aproximadamente.

Recomendaciones del trabajo

1. Realizar estudios sobre la eficiencia del sistema LSL-NPM en la purificación de proteínas de fusión en medios complejos, por ejemplo, medios de cultivo.
2. Estudiar los procesos de liberación y actividad biológica de los péptidos CIGB300 y CIGB500 tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. Evaluar los parámetros farmacocinéticos y de biodistribución, así como un estudio de dosis de las nanopartículas magnéticas recubiertas con DMSA y modificadas con PEG en modelos animales más complejos.
4. Explorar la influencia de la administración de las nanopartículas de óxido de hierro en otros puntos de la vía metabólica del hierro

Anexos

Anexo I: Magnetismo

Anexo II: Técnicas experimentales

Anexo I: Magnetismo

Las propiedades magnéticas de un material van a depender básicamente de los electrones de los átomos que lo constituyen, específicamente del número de electrones desapareados que posea cada átomo así como del orbital en el que se encuentren. Al aplicar un campo magnético externo al material, los electrones dan lugar a dipolos magnéticos que se ordenan con el campo dando lugar a un momento magnético dentro de éste. Según la respuesta frente al campo magnético externo los materiales se pueden clasificar en *diamagnético*, *paramagnético*, *ferromagnético* y *superparamagnético*. Este tipo de propiedad se denomina *susceptibilidad* (χ) y está caracterizada por la relación entre la *magnetización* (M) y el *campo magnético* (H) (Cullity and Graham, 2009).

$$\chi = \frac{M \text{ (emu)}}{H \text{ (Oe} \cdot \text{cm}^3\text{)}}$$

Los materiales *diamagnéticos* son aquellos donde sus átomos presentan todos los electrones apareados, y en conjunto unos se contrarrestan con otros. Al aplicar un campo magnético se fuerza a la generación de dipolos magnéticos dando lugar a una corriente inducida que tiende a oponerse a ese campo magnético (Ley de Lenz). La susceptibilidad de estos materiales será entonces negativa ($\chi < 0$) y van a repeler débilmente el campo magnético aplicado. Un ejemplo de material diamagnético es el agua y las proteínas dentro del cuerpo humano, o sea, aquellos elementos que contienen carbono, hidrógeno y nitrógeno (Pankhurst et al., 2003).

En el caso de los materiales que presentan electrones desapareados y las interacciones entre estos son débiles, se trata de materiales *paramagnéticos*. Estos materiales van a presentar una susceptibilidad ligeramente positiva y proporcional al campo magnético ($\chi > 0$). Al aplicar el campo magnético aparecen dipolos que se alinean en la misma dirección y sentido del campo ya que esta es la forma de menor energía. Sin embargo, al eliminar el campo magnético, las fluctuaciones térmicas provocan que los espines se muevan al azar obteniéndose un momento magnético nulo. En estos materiales la magnetización resultante (m) se puede calcular mediante la ecuación de la Ley de Curie, donde H es el campo aplicado, T es la temperatura absoluta y C es la constante de Curie dependiente de cada material.

$$m = C \frac{H}{T}$$

Un ejemplo de este comportamiento es la hemoglobina que presenta en su interior un ión Fe que posee electrones desapareados pero que por encontrarse tan lejos de otros iones Fe no pueden interactuar entre ellos (Pankhurst et al., 2003).

Por otra parte, si la estructura cristalina del material permite que las interacciones electrónicas entre los átomos vecinos sean fuertes, este va a presentar un comportamiento *ferromagnético*. En el caso de materiales como el hierro, el níquel o el cobalto, todos los momentos magnéticos están orientados en la misma dirección, paralela o antiparalelamente, (incluso en ausencia de campo magnético externo aplicado) debido a que los electrones interactúan mediante un mecanismo de intercambio (superintercambio en el caso de óxidos metálicos ya que interactúan a través de los átomos de oxígeno) (Coey, 1988). En el caso de que los electrones se alineen antiparalelamente, si el momento magnético se anula el sólido es antiferromagnético, mientras que si el momento magnético resultante no se anula el sólido es ferrimagnético (Raikher and Shliomis, 1974).

Si todos los momentos magnéticos se orientan en la misma dirección se generaría una elevada energía magnetoestática, por lo cual el sólido reagrupa a los espines en regiones llamadas dominios magnéticos (Cullity and Graham, 2009). El concepto de dominio permite distinguir el ferromagnetismo del paramagnetismo. Aunque se genere energía en la interfase de unos dominios con otros (paredes de dominio), esta configuración multidominio dentro del sólido es la más favorable desde el punto de vista energético (Kittel, 1946). Sin embargo, si el tamaño del sólido disminuye por debajo del tamaño del dominio magnético (D_{CRIT}), el sólido posee todos sus momentos magnéticos orientados en la misma dirección cuando se le aplica un campo magnético. Esto da lugar a un dipolo permanente dentro del sólido de una magnitud similar a la de los sólidos ferromagnéticos y unas 100 veces mayor que los paramagnéticos (Frenkel and Dorfman, 1930; Kittel, 1946). En ausencia de campo magnético, este dipolo se mantiene (comportamiento ferromagnético dentro del monodominio) hasta bajar hasta un tamaño ($D_{\text{S-F}}$) a partir del cual los dipolos se orientan al azar y por tanto el momento magnético resultante es nulo, al igual que los sólidos paramagnéticos. Este comportamiento es típico de sólidos *superparamagnéticos*. Por tanto, las partículas ferromagnéticas van a presentar magnetización uniforme en aquellas partículas de tamaño menor a D_{CRIT} y magnetización no uniforme en las partículas mayores. Las primeras serán consideradas partículas monodominio y las últimas multidominio.

Por otra parte, la respuesta de los materiales ferromagnéticos ante la aplicación de un campo quedará definida por la presencia de un ciclo de histéresis caracterizado por dos parámetros: la coercividad y la remanencia. La coercividad es la intensidad del campo magnético que se debe aplicar para reducir a 0 la magnetización del material una vez que este ha sido magnetizado hasta saturación. Este parámetro es indicador de la resistencia del material ferromagnético a ser desmagnetizado y en el caso de las nanopartículas magnéticas es de gran importancia, ya que depende enormemente del tamaño de partícula.

En el caso de las nanopartículas superparamagnéticas, los dipolos en ausencia de campo magnético se orientarán al azar y esto constituye una gran ventaja para su uso en aplicaciones biomédicas. Las NPMs se convierten en magnéticas solo en presencia de un imán y al retirarse este vuelven a su estado no magnético. Esto evita un comportamiento activo de las nanopartículas en ausencia de campo y representa una ventaja excepcional de manipulación en dicho sistema biológico.

Anexo II: Técnicas experimentales

1. La **Microscopía Electrónica de Transmisión** se utilizó para medir el tamaño, forma y distribución de las partículas tanto en medio orgánico como después de transferidas a medio acuoso. Se depositó una gota diluida de las diferentes suspensiones de nanopartículas sobre una rejilla de cobre y se dejó secar en una estufa a 50°C antes de ser observadas al microscopio electrónico. La visualización de las partículas se llevó a cabo en un microscopio de la marca JEOL modelo 2000 FXII que opera con una diferencia de potencial de 200 KeV y posee una resolución de 3 Å. Para realizar el análisis del tamaño de partícula de cada muestra se midió la longitud más grande de cada partícula de al menos 200 partículas con la ayuda del programa libre Gwyddion (<http://gwyddion.net/>). El cálculo del tamaño medio de partícula de cada muestra y su grado de polidispersidad (σ) se realizó ajustando los datos a una función de distribución logarítmica normal con el empleo del programa Origin Pro 8.

El microscopio electrónico se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador que tienen la función de registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío se encuentran un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas. El esquema del microscopio electrónico se puede observar en la Figura 1. Para la obtención de una imagen, el cañón electrónico produce un haz de electrones que es acelerado mediante una diferencia de potencial que puede oscilar entre 80 y 600 KeV dependiendo del modelo. El haz es dirigido y focalizado por las lentes condensadoras hacia la rejilla donde está depositada la muestra. Una vez que interactúan con la muestra unos electrones chocarán y otros la atravesarán formándose así una imagen gracias a la lente objetivo, que posteriormente será aumentada y proyectada por la lente proyectora.

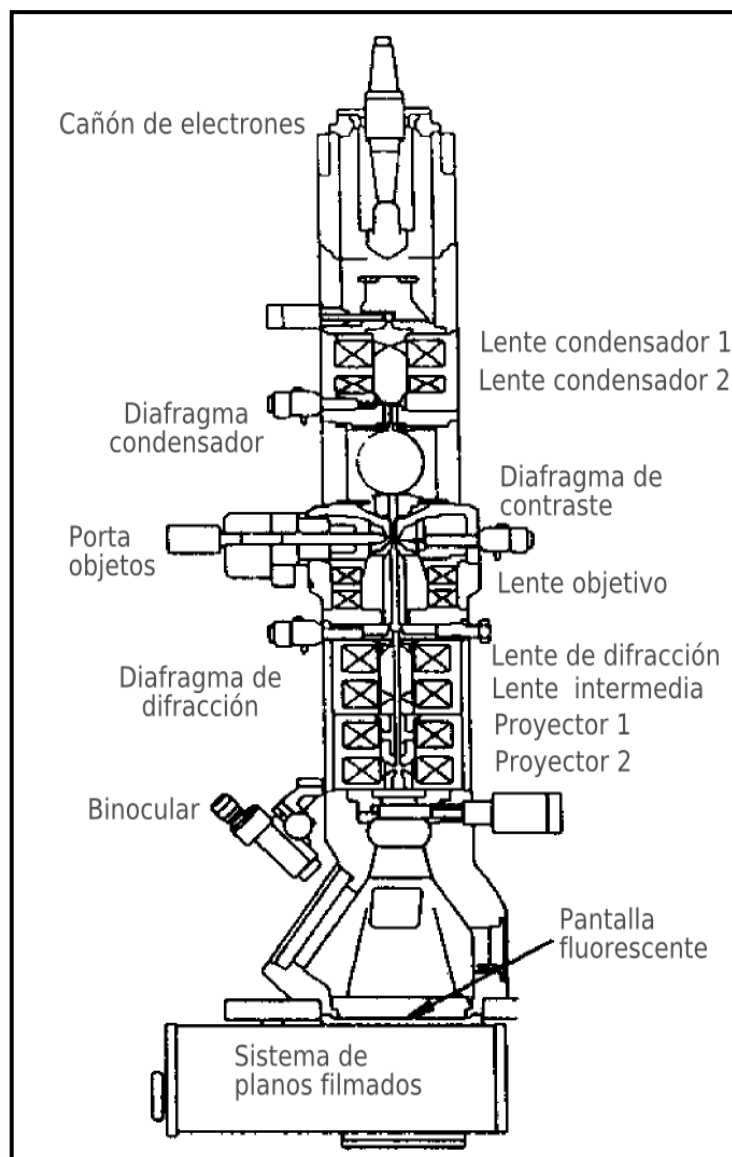


Figura 1. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.

2. Con la **Espectroscopía Infrarroja** se caracterizó el recubrimiento de las nanopartículas a través de la identificación de los grupos funcionales. Las muestras se prepararon al 2% en peso de nanopartículas en KBr y compactaron hasta formar la pastilla que se emplea para el análisis. El registro de los espectros se llevó a cabo en un espectrofotómetro de transformada de Fourier Nicolet 20 SXC, barriendo la región de energías comprendida entre 3600 y 300 cm^{-1} . La resolución del equipo en las medidas es de 2 cm^{-1} .

Los espectros de absorción en la región del infrarrojo tienen lugar a consecuencia de que los átomos enlazados vibran a frecuencias dentro de esta región. Estos cambios de energía son producidos por las transiciones energéticas de los grupos atómicos al cambiar de unos estados vibracionales y

rotacionales a otros. Cada grupo atómico o molécula tiene un espectro de absorción característico y está compuesto por distintas bandas de absorción, cada una de ellas debidas a un tipo de enlace determinado (caracterizado por la fuerza de enlace y los átomos que lo forman) y a su modo de vibrar.

El equipo utilizado en este caso para medir espectros IR consta de una fuente que es un cilindro de SiC por la que pasa una corriente eléctrica que lo eleva a 1200 °C y desprende radiación infrarroja, una pieza llamada “beam splitter” que se encarga de desdoblar el haz IR en 2 partes y enviar la mitad de la radiación a un espejo fijo y la otra mitad a un espejo móvil que pasa a través de la muestra. Posteriormente los haces vuelven a ser recombinados y la variación en intensidad del haz en función del tiempo da como resultado un interferograma (intensidad en función del tiempo) que es traducido por el interferómetro aplicando la transformada de Fourier dando lugar al espectro (intensidad en función de la frecuencia). Durante el registro del espectro, un haz de láser de He-Ne calibra internamente la frecuencia del aparato.

3. El **Análisis Termogravimétrico** a 10°C/min y en flujo de aire de aproximadamente 10 mg de muestras, previamente secadas a 50°C en la estufa permitió cuantificar dicho recubrimiento orgánico en los diferentes procesos de síntesis y posterior modificación superficial. Los análisis termogravimétricos se han llevado a cabo en un equipo Seiko TG/ATD 320 U, SSC 5200. Los análisis se han llevado a cabo desde una temperatura inicial de 20 °C hasta una temperatura final de 1100 °C con un gradiente de subida de 10 °C/min y en presencia de un flujo de aire de 100 mL/min para ayudar a la eliminación del residuo de la muestra. También se realizaron algunas medidas bajo flujo de oxígeno para aumentar la velocidad de combustión de la muestra.

La técnica de análisis termogravimétrico se basa en la continua medición de la masa de una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo bajo una atmósfera adecuada que puede ser de aire estático, aire dinámico, O₂, N₂, Ar o H₂. El equipo de termogravimetría consta de una balanza analítica muy sensible (LD 10⁻² mg) para registrar pequeñas variaciones del peso de la muestra, un horno que es el lugar donde se lleva a cabo el calentamiento de la muestra a una velocidad controlada, un sistema de gas de purga que proporciona una atmósfera inerte o reactiva y un microprocesador que controla el instrumento en todo momento y adquiere y visualiza los datos.

4. El **Magnetómetro de Muestra Vibrante** ha permitido evaluar las propiedades magnéticas de las nanopartículas en polvo y en líquido, así como su

cuantificación en las diferentes muestras de tejidos. Se registraron las curvas de imanación a temperatura ambiente después de aplicar un campo máximo de entre 1 y 5 T, en función de la muestra y el tipo de estudio. Este tipo de medidas permite conocer el valor de la magnetización de saturación (M_s), que es el valor de la magnetización cuando todos los momentos magnéticos se encuentran alineados con el campo magnético externo aplicado (H). M_s es una propiedad intrínseca del material, por lo que conociendo la M_s de una mezcla podemos saber el porcentaje de material magnético presente en la misma. El modelo de magnetómetro de muestra vibrante utilizado para la caracterización magnética ha sido el VSM, MLVSM9 MagLab 9 T, Oxford Instruments. La caracterización de las medidas magnéticas de los tejidos liofilizados y macerados se lleva a cabo depositando una pequeña cantidad de la muestra en polvo (entre 70 y 100 mg) en el interior de una cápsula de gelatina. El polvo es compactado al fondo de la cápsula de gelatina al introducir algodón y así dejarlo inmovilizado. Por último, se coloca en una pajita hecha por kapton (tipo especial de celo adhesivo que no da señal magnética) y se introduce en el interior del magnetómetro.

Un magnetómetro de muestra vibrante (el esquema se muestra en la Figura 2) consta de un electroimán (para campos menores de 3 T) o una bobina superconductora (para campos magnéticos altos) (Figura 2.9) que se encargan de generar el campo magnético sobre la muestra, dos bobinas de detección (Figura 2.6) que son las encargadas de registrar la fuerza electromotriz generada por el movimiento de la muestra, una cámara de temperatura que está llena de He (protegida por una camisa de N_2 para evitar su rápida evaporación) que se ocupa de alcanzar y mantener la temperatura deseada en la medida, un dispositivo de vibración de la muestra (Figura 2.1 y 2.2) que se ocupa de hacerla vibrar a una frecuencia y amplitud deseadas, un amplificador de señal (Figura 2.4) para aumentar la sensibilidad de la medida, y por último un ordenador desde el cual se controla el estado del magnetómetro, el tipo de experimento a realizar, las variables de éste y el registro de las distintas medidas llevadas a cabo por el magnetómetro.

Para obtener la medida del momento magnético de la muestra, ésta se sitúa entre las bobinas de detección, vibrando a una frecuencia y amplitud característica. Al aplicar un campo magnético perpendicular (en el caso del electroimán) o paralelo (para bobina) al movimiento de la muestra se genera un cambio de flujo magnético. Este cambio de flujo genera una fuerza electromotriz en las bobinas de detección que es proporcional al momento magnético de la

muestra. Para los ciclos de magnetización se satura la muestra aplicando un campo de 1 T y a continuación se ha registrado el ciclo a una velocidad de 0,1 T/min.

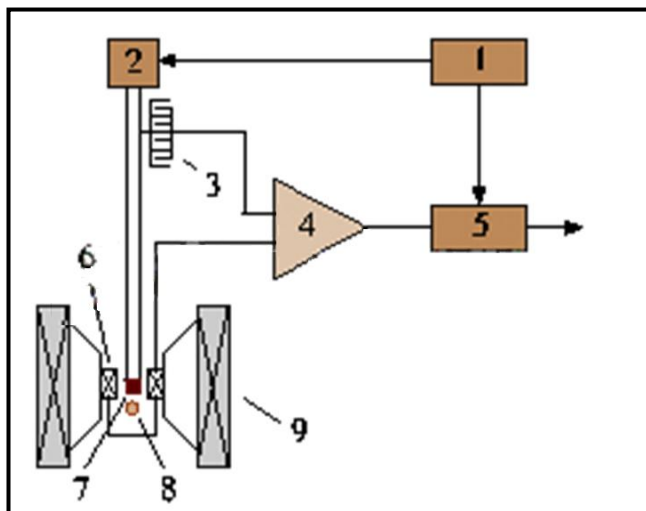


Figura2. Esquema de un Magnetómetro de Muestra Vibrante. 1: oscilador, 2: transductor, 3: condensador de frecuencia y la medición de la amplitud, 4: amplificador diferencial, 5: detector, 6: bobinas de captación, 7: muestra que se analiza, 8: sensor de, 9: polos de electroimán y bobinas.

5. Las medidas de **Susceptibilidad AC** de los órganos se realizaron en un magnetómetro SQUID con opción de medidas AC (Universidad de Zaragoza). Se midió la susceptibilidad AC entre 5 y 300 K de temperatura. La amplitud del campo alterno ha sido en todos los casos de 0,41 Oe y la frecuencia de 11 Hz. Este tipo de medidas permite diferenciar los distintos tipos de material magnético presente en una muestra, de forma que podemos distinguir la respuesta producida por las nanopartículas acumuladas en los tejidos extraídos de los distintos grupos de tratamiento y la que se debe a otros componentes magnéticos que pueda contener el tejido (ferritina).
6. La técnica de **Dispersión Dinámica de Luz** (DLS) permitió la caracterización de las propiedades coloidales de las nanopartículas. La medición de los diámetros hidrodinámicos (D_h) de las suspensiones se realizó a pH 7 en medio acuoso determinando el promedio de las medidas de intensidad. El grado de polidispersidad de la muestra (PDI, por sus siglas en inglés), se determinó dividiendo la desviación estándar de los valores entre el valor medio. La medición del potencial-Z de las partículas se realizó utilizando una solución de 0,001 M de KNO_3 , mientras que la variación de pH del medio se realizó empleando soluciones a 0,001 M de KOH o HCl. En el presente trabajo las

medidas del diámetro hidrodinámico se han llevado a cabo con el equipo de dispersión de luz NANO SIZER ZS de Malvern Instruments. Las medidas del diámetro hidrodinámico se han registrado en el modo intensidad.

La medición del diámetro hidrodinámico (D_h) de las partículas se realiza a partir de la medida del movimiento browniano (parametrizado en el coeficiente traslacional) de éstas, es decir a partir del movimiento al azar de las partículas dentro del solvente por efecto del choque con las moléculas del medio que las rodea. Se relaciona posteriormente con el tamaño hidrodinámico a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_h = k_B T / 3\pi \eta D_{dif}$$

donde D_h es el diámetro hidrodinámico, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad del disolvente y D_{dif} el coeficiente traslacional de difusión de la partículas.

Al incidir un haz de luz sobre las partículas en suspensión, éstas dispersan la luz en todas direcciones, llegando a un detector en un ángulo determinado. El detector registra las fluctuaciones de la intensidad de luz a lo largo del tiempo, que son debidas al movimiento de las partículas. La comparación de las fluctuaciones a lo largo del tiempo con respecto a la primera señal permite crear una función de correlación. Si las partículas que se están midiendo son de pequeño tamaño la función de correlación decae rápidamente, debido al rápido movimiento de las partículas. Sin embargo, si las partículas son más grandes la función de correlación decae lentamente.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los datos se obtienen por intensidad de luz dispersada en función del tamaño hidrodinámico (modo intensidad). Hay otros dos modos de obtener el tamaño hidrodinámico, como distribución de volúmenes (modo volumen) y de número (modo número) de nanopartículas. Esta conversión se realiza a partir del índice de refracción de la muestra y aplicando la teoría de Mie y tiene sentido hacerla cuando en el modo intensidad se obtienen dos picos o un pico con una cola apreciable ya que las partículas o agregados de mayor tamaño dispersan más luz que los pequeños debido a que la intensidad es proporcional al D_h (aproximación de Rayleigh) y daría una visión más realista de lo que sucede.

La medición de la carga superficial de las partículas se realiza a partir de la medida de la velocidad con la que migran las partículas al aplicar una diferencia de potencial a los electrodos de la célula que contiene la suspensión (movilidad electroforética). Este registro de la movilidad electroforética se lleva a cabo a

partir de la técnica de velocimetría de láser. Doppler en la que se mide las fluctuaciones del haz dispersado a un ángulo de 17° y se combina con un haz de referencia. La combinación de estos haces da como resultado un haz en el que la intensidad de las fluctuaciones es directamente proporcional a la velocidad de las partículas. A partir de la obtención de la movilidad electroforética se puede calcular el potencial ξ aplicando la ecuación de Henry:

$$U_e = 2\varepsilon \xi f(ka) / 3\eta$$

donde U_e es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica del medio, ξ es el potencial zeta, η es la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry cuyo valor puede ser igual a 1,5 en el caso de partículas alrededor de 200 nm dispersadas en medios con fuerza iónica mayor de 10^{-3} M (aproximación de Smoluchowski) o de 1 en el caso de partículas más pequeñas (aproximación de Hückel).

7. Mediante **Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)** se ha podido conocer la concentración de Fe de las suspensiones, así como en las muestras de sangre y tejidos analizadas. Las muestras se digirieron con agua regia y se calentaron a 80°C durante 1 hora. Dada la naturaleza inorgánica de las partículas de magnetita y la naturaleza orgánica de los recubrimientos utilizados, así como las muestras de tejido se ha utilizado ácido nítrico y clorhídrico para el procedimiento de digestión de las muestras. Para ello se añaden a un matraz aforado 200 μL de la suspensión a analizar y se añaden posteriormente unas gotas de ácido nítrico con una pipeta Pasteur para oxidar el recubrimiento orgánico que recubre las partículas. A continuación, se añaden unas gotas de ácido clorhídrico para que todo el hierro de las nanopartículas pase a estar como iones libres en la solución y se dejan durante una hora a 80°C para que se complete el proceso de digestión. Por último se añade agua a la muestra para diluirla hasta enrasar a 25 mL.

El equipo utilizado para la realización de estos análisis ha sido el (ICP) PERKIN ELMER OPTIMA 2100 DV que posee un nebulizador neumático y utiliza el plasma de Ar de acoplamiento inductivo para excitar los átomos. Los calibrados han sido realizados tomando disoluciones patrón de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ al 2% en ácido nítrico.

Para llevar a cabo los análisis por ICP es necesario tener los átomos de la especie a analizar en disolución (ya sean ionizados o en estado fundamental). Una vez introducida en la cámara de la muestra, la disolución es nebulizada por un capilar debido al paso de una corriente de gas a alta presión formándose finalmente un aerosol. Este aerosol pasa a una cámara donde es puesto en

contacto con el plasma de Ar y los átomos son excitados llevando sus electrones a niveles electrónicos superiores. Estos electrones volverán a su estado fundamental emitiendo fotones de una longitud de onda característica de cada elemento. Esta energía es monocromada a la longitud de onda donde es más probable que se haya llevado a cabo la excitación del elemento a analizar y a la que no haya posibles interferencias. Posteriormente la radiación pasa por un fotomultiplicador y es recogida y transformada en señal eléctrica por el detector. La señal eléctrica registrada es proporcional al número de fotones que la lleguen y por tanto al número de átomos excitados.

8. Mediante la técnica de **Relaxometría H-RMN** se determinaron los tiempos de relajación, tanto T_1 como T_2 , de los núcleos de hidrógeno desde su estado excitado hasta su estado fundamental. A partir de estos se calcularon los valores de relaxividad (R_i , $1/T_i$, s^{-1} , $i = 1, 2$) de las suspensiones de nanopartículas, así como de las muestras de sangre se obtuvieron a través de la medición de los tiempos de relajación (T_i , s) a 37 °C, empleando un campo magnético de 1.5 T y una secuencia T_2 CP. El ajuste lineal de los valores de R_i a diferentes concentraciones de Fe permitió calcular el valor de relaxividad de las muestras (r_i , $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$) mediante la ecuación: $R_i = R_{b_i} + r_i[\text{Fe}]$.

Las medidas se han realizado en un espectrómetro MINISPEC MQ60 de Bruker. El aparato basa su funcionamiento entorno a las propiedades del átomo de hidrógeno. Éste posee una carga positiva en el núcleo y un espín nuclear que hace que posea un momento magnético. Al aplicar un campo magnético, los momentos magnéticos nucleares de los átomos de los protones se alinearán en su dirección precesionando en torno a él a una frecuencia proporcional a la fuerza del campo magnético.

Para detectar el campo magnético originado por los espines nucleares y aislarlo se suele aplicar secuencias de pulsos de radiofrecuencia de 90 y 180° para sacar fuera del estado de equilibrio a los espines e invertir la magnetización. La secuencia de pulsos escogida depende del tipo de medida que se vaya a realizar. De esta manera se origina un campo magnético oscilante en el plano perpendicular al campo magnético aplicado que genera un voltaje alterno en las bobinas de detección que es la señal de RMN. Esta señal es medida y decae a lo largo del tiempo debido a que los protones que están en estado excitado vuelven a su estado fundamental donde sus momentos magnéticos nucleares vuelven a alinearse con el campo (la señal de RMN decae por la relajación).

La relajación viene caracterizada por dos parámetros, T₁ y T₂. El T₁ es conocido como el tiempo de relajación longitudinal o espín-red y mide la velocidad a la cual el sistema recupera el equilibrio a lo largo de la dirección del campo aplicado (eje z) después de la aplicación de la secuencia de pulsos de radiofrecuencia. El T₂ es conocido como el tiempo de relajación transversal o espín-espín y mide la velocidad con la que decae la señal en el plano xy después de aplicar la secuencia de pulsos.

9. El **ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)** que emplea un anticuerpo para la detección específica del PEG se utilizó para la caracterización del recubrimiento de las nanopartículas modificadas con los diferentes polímeros. Se tapizó la placa de ELISA con el anticuerpo PEG02 (5 µg/ml en PBS (80 µl/pocillo)) a 4°C durante la noche. Posteriormente se lavó la placa con PBS y se bloqueó PBS 1X/BSA 0.5% (180 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se preparó un lote inicial de nanopartículas a 0,5 mg/mL en PBS/BSA 0,5% y se realizaron diluciones seriadas, añadiendo 80 µL por pocillo. Se incubó durante 1 hora y se lavó 5 veces con PBS 1x. Finalizado este paso, se lava de nuevo la placa 3 veces con PBS, y se incuba con el anticuerpo PEG02 biotinilado (2 µg/ml en PBS/BSA 0,5%) durante 1 hora. Se lava de nuevo la placa 3 veces con PBS, y se incuba con el conjugado a Strep-Avidina HRP (80 µl/pocillo), 1 hora a temperatura ambiente. Se empleó la relación 12 µl de conjugado+ 18000 µl de PBS/BSA 05%. Finalmente, se lava 5 veces la placa con PBS 1X, y se añade el sustrato OPD a temperatura ambiente. Relación 10 µl H₂O₂/20 ml OPD (80 µl/pocillo). Y luego se para la reacción con H₂SO₄ 2.5 M (40 µl/pocillo). La lectura de los valores de absorbancia se realiza a 405 nm. La técnica de ELISA también fue utilizada para la cuantificación de diferentes proteínas de la ruta metabólica del hierro (DMT-1, Ferroportina, y Ferritina) a partir de homogenados de hígado, riñón y bazo de rata. Los anticuerpos monoclonales utilizados para la captura fueron Ab55735, Ab75973 y Ab85370. Para la detección se empleó un anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa y se empleó como sustrato el OPD.

Esta es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo. Existen diferentes clasificaciones del ELISA en función de cómo se realice la detección del antígeno y el revelado de la placa.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados que indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).

ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos, por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario (por ejemplo: suero sanguíneo) es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.

ELISA "sándwich" (Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de

antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

10. La **Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento** (HPLC) se utilizó para la cuantificación de los diferentes péptidos en los estudios de caracterización de las reacciones de unión péptido:nanopartículas. Se empleó una columna Aeris PEPTIDE 3.6u XB-C18 de 250 x 4.6 mm.

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, de high-performance liquid chromatography) no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de diferente peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa.

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) empleada en esta tesis consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. La fase estacionaria de esta cromatografía es la sílica tratada con RMe₂SiCl, donde la R es una cadena alquil de 18 C. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. La HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación.

11. La **Electroforesis SDS-PAGE** se utilizó para el estudio de unión de las proteínas LSL₁₅₀ y LBL₁₅₂ a NPM con diferentes tipos de recubrimiento. Se emplearon geles lineales (15% acrilamida). Estos fueron teñidos específicamente para proteínas con Coomassie brilliant blue R-250 (CBB). Las imágenes digitales de los geles fueron obtenidas con un escaner ScanJet 4c/T (Hewlett Packard) y analizadas con el software Image J v1.32. SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para

separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales y otros factores). Gracias al SDS la mayoría de proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica, por lo que se obtiene un fraccionamiento que obedece a: a la diferencia de peso, a la longitud de la cadena (tamaño) y a la forma de la proteína. Es el método de electroforesis empleado con mayor profusión para analizar proteínas.

12. Los estudios *in vivo* de **Resonancia Magnética Nuclear** (1,5 T Symphony Maestro class MRI Siemens scanner (Germany)) se realizaron empleando ratas Wistar como modelo animal. Los parámetros empleados fueron los siguientes: Secuencia de pulsos: T2 Turbo Spin Eco (TSE) con Tiempo de Eco Time (TE) de 64 ms and Tiempo de Repetición (TR) de 4000 ms. La secuencia VIBE fue examinada también con TE = 4 ms y TR = 11,3 ms. Las imágenes registradas se analizaron empleando la versión del programa eFilm 2.1.1. Se midió la intensidad de dos áreas del hígado (0,4 cm²) y se utilizó como control un área (0,1 cm²) correspondiente al músculo. Con las intensidades medidas de cada imagen I_t se determinó la relación $(I_t - I_0)/I_0$ en función del tiempo para seguir *in vivo* el proceso de absorción, residencia y excreción de las nanopartículas en el hígado.

El aparato de adquisición de imágenes de RMN consta de un gran imán que genera un campo magnético, unas bobinas que corrigen las inhomogeneidades del campo magnético, unas bobinas de radiofrecuencia que emiten una señal a la parte del cuerpo que está siendo escaneada, unas bobinas receptoras que detectan la señal de retorno, unas bobinas de gradiente que suministra la localización espacial de las señales y un ordenador que reconstruye la imagen a partir de las señales de radiofrecuencia. La intensidad de la señal vendrá dada por la densidad de protones (si forman parte de agua o de biomoléculas), los valores de T_1 y T_2 (determinan el tipo de relajación del protón) y el fluido (la intensidad disminuye si los protones se encuentran en una zona donde hay mucho movimiento de fluidos como en las arterias). La adquisición de la imagen se lleva a cabo por la superposición espacial de las señales de RMN en cada vóxel del cuerpo tras haber aplicado la secuencia de pulsos y posterior conversión de éstas en la imagen aplicando la inversa de la transformada de Fourier. Para seleccionar cada vóxel primero hay que fijar una determinada rebanada del cuerpo aplicando un pequeño campo magnético perpendicular al del imán con las bobinas de gradiente y posteriormente seleccionar la columna y la fila

deseada con las correspondientes bobinas de gradiente para esas direcciones. Para cada selección se lanza la secuencia de pulsos apropiada obteniendo por cada rebanada un mapa 2D de las señales RMN obtenidas. Por último el computador realiza la operación inversa de la transformada de Fourier para obtener la imagen espacial rebanada a rebanada

.

Referencias bibliográficas



Referencias bibliográficas

- Aguilar-Arteaga, K., Rodríguez, J.A., and Barrado, E. (2010). Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* 674, 157-165.
- Ahmed, K., Gerber, D.A., and Cochet, C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends in Cell Biology* 12, 226-230.
- Ali, L.M.A., Gutiérrez, M., Cornudella, R., Moreno, J.A., Piñol, R., Gabilondo, L., Millán, A., and Palacio, F. (2013). Hemostasis disorders caused by polymer coated iron oxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9, 1272-1285.
- Allard-Vannier, E., Cohen-Jonathan, S., Gautier, J., Herve-Aubert, K., Munnier, E., Souce, M., Legras, P., Passirani, C., and Chourpa, I. (2012). Pegylated magnetic nanocarriers for doxorubicin delivery: a quantitative determination of stealthiness in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81, 498-505.
- Amici, J., Celasco, E., Allia, P., Tiberto, P., and Sangermano, M. (2011). Poly(ethylene glycol)-coated magnetite nanoparticles: preparation and characterization. *Macromolecular Chemistry and Physics* 212, 411-416.
- Amstad, E., Gillich, T., Bilecka, I., Textor, M., and Reimhult, E. (2009). Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Letters* 9, 4042-4048.
- Andrews, N.C. (1999). Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine* 341, 1986-1995.
- Angulo, I., Acebrón, I., Rivas, B.d.l., Muñoz, R., Rodríguez-Crespo, I., Menéndez, M., García, P., Tateno, H., Goldstein, I.J., Pérez-Agote, B., *et al.* (2011). High-resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile β -trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Glycobiology* 21, 1349-1361.
- Aronis, A., Madar, Z., and Tirosh, O. (2008). Lipotoxic effects of triacylglycerols in J774.2 macrophages. *Nutrition* 24, 167-176.
- Arora, S., Rajwade, J.M., and Paknikar, K.M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and applied pharmacology* 258, 151-165.
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, R.M., and Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2, 22-32.
- AshaRani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., and Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279-290.

- Aslam, M., Fu, L., Li, S., and Dravid, V.P. (2005). Silica encapsulation and magnetic properties of FePt nanoparticles. *Journal of colloid and interface science* 290, 444-449.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., DeMeo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Bergelefranc, J.L., Botta, A., *et al.* (2006). In vitro Interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environmental Science & Technology* 40, 4367-4373.
- Avramis, V.I., and Tiwari, P.N. (2006). Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International journal of nanomedicine* 1, 241-254.
- Bareford, L.M., and Swaan, P.W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 59, 748-758.
- Barenholz, Y. (2012). Doxil-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Control Release* 160, 117-134.
- Barrera, C., Herrera, A.P., and Rinaldi, C. (2009). Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol). *Journal of colloid and interface science* 329, 107-113.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
- Bee, A., Bouchami, T., Brossel, R., Cabuil, V., Carpentier, M., Fruchart, J.M., Massart, R., Neveu, S., Pons, J.N., Robineau, M., *et al.* (1990). 9006484 (France).
- Berenbaum, M.B., Gilleo, K.B., and Evans, F.E. (1976). Nylon flame retardants based on certain organic acids, A.C. Corp., ed.
- Berlanga-Acosta, J., Vázquez-Blomquist, D., Cibrián, D., Mendoza, Y., Ochagavía, M.E., Miranda, J., Suárez, J., González-Ferrer, Y., Vila, J.M., Abreu, A., *et al.* (2012). Growth Hormone Releasing Peptide 6 (GHRP6) reduces liver fibrosis in CCl₄ chronically intoxicated rats. *Biotechnología Aplicada* 29, 60-72.
- Berry, C.C. (2005). Possible exploitation of magnetic nanoparticle-cell interaction for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry* 15, 543-547.
- Berry, C.C. (2009). Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 42, 224003.
- Bisi, G., Podio, V., Valetto, M.R., Broglio, F., Bertuccio, G., Del-Rio, G., Arvat, E., Boghen, M.F., Deghenghi, R., Muccioli, G., *et al.* (1999). Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *Journal of Endocrinological Investigation* 22, 266-272.
- Blakemore, R. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377-379.

Bowers, C.Y. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cellular and Molecular Life Sciences* 54, 1316-1329.

Cabal, C., González, E., Torne, Y., and Rojas, A. (2009). Imágenes moleculares y microimágenes de resonancia magnética en la biotecnología y la farmacéutica modernas. *Biotecnología Aplicada* 26.

Calero, M., Gutierrez, L., Salas, G., Luengo, Y., Lazaro, A., Acedo, P., Morales, M.P., Miranda, R., and Villanueva, A. (2013). Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide Nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*.

Cannon, W.R., Danforth, S.C., Flint, J.H., Haggerty, J.S., and Marra, R.A. (1982). Sinterable ceramic powders from laser-driven reactions: I, Process Description and Modeling. *Journal of the American Ceramic Society* 65, 324-330.

Carr, L., Tucker, A., and Fernández-Botrán, R. (2003). In vivo administration of L-dopa or dopamine decreases the number of splenic IFN γ -producing cells. *Journal of Neuroimmunology* 137, 87-93.

Casals, E., Gonzalez, E., and Puentes, V.F. (2012). Reactivity of inorganic nanoparticles in biological environments: insights into nanotoxicity mechanisms. *Journal of Physics D: Applied Physics* 45, 443001.

Coey, J.M.D. (1988). Magnetic properties of iron in soil iron oxides and clay minerals. In *Iron in soils and clay minerals* (Reidel Publishing Company), pp. 397-466

Cole, A.J., David, A.E., Wang, J., Galban, C.J., and Yang, V.C. (2011). Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 6291-6301.

Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M.F., Gutierrez, L., Morales, M.P., Bohm, I.B., Heverhagen, J.T., Prospero, D., and Parak, W.J. (2012). Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society reviews* 41, 4306-4334.

Collins, A.R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.

Corot, C., Robert, P., Idee, J.M., and Port, M. (2006). Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews* 58, 1471-1504.

Creixell, M., Herrera, A.P., Latorre-Esteves, M., Ayala, V., Torres-Lugo, M., and Rinaldi, C. (2010). The effect of grafting method on the colloidal stability and in vitro cytotoxicity of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 20, 8539.

- Cui, Y.R., Hong, C., Zhou, Y.L., Li, Y., Gao, X.M., and Zhang, X.X. (2011). Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85, 1246-1252.
- Cullity, B.D., and Graham, C.D. (2009). Introduction to magnetic materials, Second Edition edn (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.).
- Chaves, S.B., Lacava, L.M., Lacava, Z.G.M., Silva, O., Pelegrini, F., Buske, N., Gansau, C., Morais, P.C., and Azevedo, R.B. (2002). Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Transactions on magnetics* 38, 3231-3233.
- Chen, W., Cao, Y., Liu, M., Zhao, Q., Huang, J., Zhang, H., Deng, Z., Dai, J., Williams, D.F., and Zhang, Z. (2012). Rotavirus capsid surface protein VP4-coated Fe₃O₄ nanoparticles as a theranostic platform for cellular imaging and drug delivery. *Biomaterials* 33, 7895-7902.
- Chen, Y.J., J.Tao, Xiong, F., J.B.Zhu, Gu, N., and Geng, K.K. (2010). Characterization and in vitro cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent. *Pharmazie* 65, 481-486.
- Cheng, T.L., Cheng, C.M., Chen, B.M., Tsao, D.A., Chuang, K.H., Hsiao, S.W., Lin, Y.H., and Roffler, S.R. (2005). Monoclonal antibody-based quantitation of poly(ethylene glycol)-derivatized proteins, liposomes, and nanoparticles. *Bioconjugate chemistry* 16, 1225-1231.
- Cheng, T.L., Chuang, K.H., Chen, B.M., and Roffler, S.R. (2012). Analytical Measurement of PEGylated Molecules. *Bioconjugate chemistry*.
- Chou, T.C., Hsu, W., Wang, C.H., Chen, Y.J., and Fang, J.M. (2011). Rapid and specific influenza virus detection by functionalized magnetic nanoparticles and mass spectrometry. *Journal of Nanobiotechnology* 9.
- Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., and Jallet, P. (1996). Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of Microencapsulation* 13, 245-255.
- da Paz, M.C., Santos Mde, F., Santos, C.M., da Silva, S.W., de Souza, L.B., Lima, E.C., Silva, R.C., Lucci, C.M., Morais, P.C., Azevedo, R.B., *et al.* (2012). Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer. *International journal of nanomedicine* 7, 5271-5282.
- delaFuente, J.M., and Grazú, V. (2012). Frontiers of Nanoscience. In *Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles*, pp. 2-250.
- delaPresa, P., Luengo, Y., Multigner, M., Costo, R., Morales, M.P., Rivero, G., and Hernando, A. (2012). Study of heating efficiency as a function of concentration, size, and applied field in γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* 116, 25602-25610.

DePalma, R., Peeters, S., Bael, M.J.V., Rul, H.V.d., Bonroy, K., Laureyn, W., Mullens, J., Borghs, G., and Maes, G. (2007). Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. *Chemistry of Materials* 19, 1821.

Derfus, A.M., Chan, W.C.W., and Bhatia, S.N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* 4, 11-18.

DeRosa, E., Chiappini, C., Fan, D., Liu, X., Ferrari, M., and Tasciotti, E. (2011). Agarose surface coating influences intracellular accumulation and enhances payload stability of a nano-delivery system. *Pharm Res* 28, 1520-1530.

Dias, A.M., Hussain, A., Marcos, A.S., and Roque, A.C. (2011). A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology advances* 29, 142-155.

Dromi, S., Frenkel, V., Luk, A., Traugher, B., Angstadt, M., Bur, M., Poff, J., Xie, J., Libutti, S.K., Li, K.C.P., *et al.* (2007). Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect *Clinical Cancer Research* 13, 2722-2727.

Duan, H., Kuang, M., Wang, X., Wang, Y.A., Mao, H., and Nie, S. (2008). Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals: New insights into spin disorder and proton relaxivity. *The Journal of Physical Chemistry C* 112, 8127-8131.

Dubertret, B., P.Skourides, Norris, D.J., Noireaux, V., Brivanlou, A.H., and Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298, 1759-1762.

Eaton, M.A. (2011). How do we develop nanopharmaceuticals under open innovation? *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7, 371-375.

Esposito, D., and Chatterjee, D.K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 353-358.

Ewijk, G.A.v., Vroege, G.J., and Philipse, A.P. (1999). Convenient preparation methods for magnetic colloids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201, 31-33.

Fang, C., Bhattarai, N., Sun, C., and Zhang, M. (2009). Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. *Small* 5, 1637-1641.

Fauconnier, N., Pons, J.N., Roger, J., and Bee, A. (1997). Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *Journal of Colloid Interface Science* 194, 427-433.

Febbraio, M., Hajjar, D.P., and Silverstein, R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *The Journal of clinical investigation* 108, 785-791.

- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 5, 161-171.
- Forssen, E.A. (1997). The design and development of DaunoXome for solid tumor targeting in vivo. *Advanced drug delivery reviews* 24, 133-150.
- Frenkel, J., and Dorfman, J. (1930). Spontaneous and induced magnetisation in ferromagnetic bodies. *Nature* 126, 274-275.
- Fuguet, E., Ràfols, C., Rosés, M., and Bosch, E. (2005). Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Analytica Chimica Acta* 548, 95-100.
- Gamarra, L.F., daCosta-Filho, A.J., Mamani, J.B., Ruiz, R.C., Pavon, L.F., Sibov, T.T., Vieira, E.D., Silva, A.C., Pontuschka, W.M., and Jr, E.A. (2010). Ferromagnetic resonance for the quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological materials. *International journal of nanomedicine* 5, 203-211.
- Garcell, L., Morales, M.P., Andres-Vergés, M., Tartaj, P., and Serna, C.J. (1998). Interfacial and rheological characteristics of maghemite aqueous suspensions. *Journal of colloid and interface science* 205, 470-475.
- Ge, G., Wu, H., Xiong, F., Zhang, Y., Guo, Z., Bian, Z., Xu, J., Gu, C., Gu, N., Chen, X., *et al.* (2013). The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells. *Nanoscale research letters* 8.
- Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nieb, F., and Gu, N. (2009). Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 294-301.
- Gentry, P.A. (2004). Comparative aspects of blood coagulation. *Veterinary journal* 168, 238-251.
- Geppert, M., Hohnholt, M.C., Thiel, K., Nürnberger, S., Grunwald, I., Rezwan, K., and Dringen, R. (2011). Uptake of dimercaptosuccinate-coated magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *Nanotechnology* 22.
- Ghavidel, A., and Schultz, M.C. (2001). TATA binding protein associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* 106, 575-584.
- Gordon, E.M., and Hall, F.L. (2010). Rexin-G, a targeted genetic medicine for cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 10, 819-832.
- Greaves, P. (2012). *Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety evaluation*, Elsevier, ed.
- Gu, L., Fang, R.H., Sailor, M.J., and Park, J.H. (2012). In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. *ACSnano* 6, 4947-4954.

Guarneri, V., Dieci, M.V., and Conte, P. (2012). Enhancing intracellular taxane delivery: current role and perspectives of nanoparticle albumin-bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. *Expert Opinion in Pharmacotherapy* 13, 395-406.

Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., Wang, H., Green, J.E., and Ahmed, K. (2001). A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 5992-5999.

Gupta, A.K., and Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995-4021.

Gutierrez, L., Lazaro, F.J., Abadia, A.R., Romero, M.S., Quintana, C., Morales, M.P., Patino, C., and Arranz, R. (2006). Bioinorganic transformations of liver iron deposits observed by tissue magnetic characterisation in a rat model. *Journal of inorganic biochemistry* 100, 1790-1799.

Gutiérrez, L., Mejías, R., Barber, D.F., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C.J., Lázaro, F.J., and Morales, M.P. (2011). Ac magnetic susceptibility study of in vivo nanoparticle biodistribution. *Journal of Physics D: Applied Physics* 44, 255002.

Gutiérrez, L., Morales, M.P., and Lázaro, F.J. (2013). Prospects about magnetic nanoparticles for systemic administration: synthesis and quantitative detection. *Physical Chemistry Chemical Physics* 00, 1-3.

Hamm, B., Staks, T., Taupitz, M., Maibauer, R., Speidel, A., Huppertz, A., Frenzel, T., Lawaczek, R., Wolf, K.J., and Lange, L. (1994). Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 4, 659-668.

Hansen, L., Larsen, E.K., Nielsen, E.H., Iversen, F., Liu, Z., Thomsen, K., Pedersen, M., Skrydstrup, T., Nielsen, N.C., Ploug, M., *et al.* (2013). Targeting of peptide conjugated magnetic nanoparticles to urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) expressing cells. *Nanoscale* 5, 8192-8201.

Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S., and Sun, S. (2010). Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Advanced Materials* 22, 2729-2742.

Hartz, D., McPheeters, D.S., Green, L., and Gold, L. (1991). Detection of *Escherichia coli* ribosome binding at translation initiation sites in the absence of tRNA. *Journal of Molecular Biology* 218, 99-105.

Herranz, F., Morales, M.P., Roca, A.G., Vilar, R., and Ruiz-Cabello, J. (2008). A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast media & molecular imaging* 3, 215-222.

- Hohnholt, M.C., and Dringen, R. (2011). Iron-dependent formation of reactive oxygen species and glutathione depletion after accumulation of magnetic iron oxide nanoparticles by oligodendroglial cells. *Journal of nanoparticle research* 13, 6761-6774.
- Hou, Y., Liu, Y., Chen, Z., Gu, N., and Wang, J. (2010). Manufacture of IRDye800CW-coupled Fe₃O₄ nanoparticles and their applications in cell labeling and *in vivo* imaging. *Journal of Nanobiotechnology* 8.
- Huber, D.L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 1, 482-501.
- Huh, Y.M., Jun, Y.W., Song, H.T., Kim, S., Choi, J.S., Lee, J.H., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S., and Cheon, J. (2005). In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* 127, 12387-12391.
- Hyeon, T., Lee, L.L., Park, J., Chung, Y., and Na, H.B. (2001). Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *Journal of American Chemical Society* 123, 12798-12801.
- Iijima, M., and Kamiya, H. (2009). Surface modification for improving the stability of nanoparticles in liquid media. *KONA Powder and Particle Journal* 27, 119-129.
- Inderbitzin, D., Stoupis, C., Sidler, D., Gass, M., and Candinas, D. (2007). Abdominal magnetic resonance imaging in small rodents using a clinical 1.5 T MR scanner. *Methods* 43, 46-53.
- J.J. Alonso, A.C., R. De la Prieta, T. Pereira, C. Ruiz, C. Aguirre (2002). General basis of iron metabolism. *Gac Med Bilbao* 99, 33-37.
- Jain, K.K. (2010). Advances in the field of nanooncology. *BMC medicine* 8, 83.
- Jałoszyński, P., Kujawski, M., Czub-Świerczek, M., Markowska, J., and Szyfter, K. (1997). Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutation Research/DNA Repair* 385, 223-233.
- Jun, Y.W., Huh, Y.M., Choi, J.S., Lee, J.H., Song, H.T., Kim, S., Yoon, S., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S., *et al.* (2005). Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilisation for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society* 127, 5732-5733.
- Kingsley, J.D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H.E., and Destache, C.J. (2006). Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1, 340-350.
- Kittel, C. (1946). Theory of the structure of ferromagnetic domains in films and small particles. *Physical Review* 70, 965-971.

Kohler, N., Fryxell, G.E., and Zhang, M. (2004). A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell. *Journal of the American Chemical Society* 126, 7206-7211.

Kohler, N., Sun, C., Fichtenholtz, A., Gunn, J., Fang, C., and Zhang, M. (2006). Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* 2, 785-792.

Kommareddy, S., and Amiji, M. (2007). Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice. *Journal of pharmaceutical sciences* 96, 397-407.

Kumagai, M., Imai, Y., Nakamura, T., Yamasaki, Y., Sekino, M., Ueno, S., Hanaoka, K., Kikuchi, K., Nagano, T., Kaneko, E., *et al.* (2007). Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 56, 174-181.

Kwon, S.G., Piao, Y., Park, J., Angappane, S., Jo, Y., Hwang, N.M., Park, J.G., and Hyeon, T. (2007). Kinetics of monodisperse iron oxide nanocrystal formation by "heating-up" process. *Journal of the American Chemical Society* 129, 12571-12584.

Lai, Y., Yin, W., Liu, J., Xi, R., and Zhan, J. (2009). One-pot green synthesis and bioapplication of L-Arginine-capped superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Nanoscale research letters* 5, 302-307.

LaMer, V.K., and Dinegar, R.H. (1950). Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society* 72, 4847-4854.

Lamon, S., Giraud, S., Egli, L., Smolander, J., Jarsch, M., Stubenrauch, K.G., Hellwig, A., Saugy, M., and Robinson, N. (2009). A high-throughput test to detect C.E.R.A. doping in blood. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 50, 954-958.

Lartigue, L., Alloyeau, D., Kolosnjaj-Tabi, J., Javed, Y., Guardia, P., Riedinger, A., Péchoux, C., Pellegrino, T., Wilhelm, C., and Gazeau, F. (2013). Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution in situ monitoring. *ACS Nano* 28, 3939-3952.

Lattuada, M., and Hatton, T.A. (2007). Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles. *Langmuir* 23, 2158-2168.

Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Hafeli, U.O., and Mahmoudi, M. (2012). Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and "cell vision". *PloS one* 7, e9997.

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L.V., and Muller, R.N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews* 108, 2064-2110.

- Laurent, S., and Mahmoudi, M. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 2, 367-390.
- Lechuga, L.M. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. In *Biotecnología aplicada a la salud humana*, S.L. Edikamed, ed., pp. 98-112.
- Lee, D.C., Smith, D.K., Heitsch, A.T., and Korgel, B.A. (2007). Colloidal magnetic nanocrystals: synthesis, properties and applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)* 103, 351-402.
- Lee, J.H., Choi, H.K., Lee, S.Y., Lim, M.W., and Chang, J.H. (2011). Enhancing immunoassay detection of antigens with multimeric protein Gs. *Biosensors and Bioelectronics* 28, 146-151.
- Leslie-Pelecky, D.L., and Rieke, R.D. (1996). Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials* 8, 1770-1783.
- Levy, M., Luciani, N., Alloyeau, D., Elgrabli, D., Deveaux, V., Pechoux, C., Chat, S., Wang, G., Vats, N., Gendron, F., *et al.* (2011). Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3988-3999.
- Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49.
- Liu, J., Erogbogbo, F., Yong, K.T., Ye, L., Liu, J., Hu, R., Chen, H., Hu, Y., Yang, Y., Yang, J., *et al.* (2013). Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: Studies in mice and monkeys. *ACS Nano* 7, 7303-7310.
- Liu, Y., Chen, Z., Gu, N., and Wang, J. (2011). Effects of DMSA-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on global gene expression of mouse macrophage RAW264.7 cells. *Toxicology Letters* 205, 130-139.
- Lopez, A., Gutierrez, L., and Lazaro, F.J. (2007). The role of dipolar interaction in the quantitative determination of particulate magnetic carriers in biological tissues. *Physics in medicine and biology* 52, 5043-5056.
- Lowenstam, H. (1962). Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Geological Society of America Bulletin* 73, 435-438.
- Lu, A.H., Salabas, E.L., and Schuth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 1222-1244.
- Luengo, Y., Nardecchia, S., Morales, M.P., and Serrano, M.C. (2013). Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles. *Nanoscale* 5, 11428-11437.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Bergga, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G., and Dawson, K. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *acs nano* 5, 7503-7509.

- M.R. Cimpan, Mordal, T., Schölermann, J., Allouni, Z.E., Pliquet, U., and Cimpan, E. (2013). An impedance-based high-throughput method for evaluating the cytotoxicity of nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* 429, 012026.
- Ma, H.L., Xu, Y.F., Qi, X.R., Maitani, Y., and Nagai, T. (2008). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *International journal of pharmaceutics* 354, 217-226.
- Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., and Petri-Fink, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews* 112, 2323-2338.
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M.A., Milani, A.S., Hafeli, U.O., and Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75, 300-309.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., and Jordan, A. (2011). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology* 103, 317-324.
- Mancheño, J.M., Tateno, H., Goldstein, I.J., Martínez-Ripoll, M., and Hermoso, J.A. (2005). Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *The Journal of biological chemistry* 280, 17251-17259.
- Markides, H., Rotherham, M., and Haj, A.J.E. (2012). Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of Nanomaterials* 2012, 1-11.
- Martignoni, M., Groothuis, G., and Kanter, R.d. (2006). Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 1047-1054.
- Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media *Magnetics, IEEE Transactions* 17, 1247-1248.
- Massart, R., Roger, J., and Cabuil, V. (1995). New trends in chemistry of magnetic colloids: Polar and non polar magnetic fluids, emulsions, capsules and vesicles *Brazilian Journal of Physics* 25, 135-141.
- Mejias, R., Costo, R., Roca, A.G., Arias, C.F., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreno, T., del Puerto Morales, M., Serna, C.J., Manes, S., and Barber, D.F. (2008). Cytokine adsorption/release on uniform magnetic nanoparticles for localized drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 130, 168-174.

Mejías, R., Gutiérrez, L., Salas, G., Pérez-Yagüe, S., Zotes, T.M., Lázaro, F.J., Morales, M.P., and Barber, D.F. (2013). Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 171, 225-233.

Mejías, R., Perez-Yague, S., Gutierrez, L., Cabrera, L.I., Spada, R., Acedo, P., Serna, C.J., Lazaro, F.J., Villanueva, A., Morales Mdel, P., *et al.* (2011). Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 32, 2938-2952.

Mejías, R., Pérez-Yagüe, S., Roca, A.G., Pérez, N., Villanueva, A., Cañete, M., Mañes, S., Ruiz-Cabello, J., Benito, M., Labarta, A., *et al.* (2010). Liver and brain imaging through dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 5, 397-408.

Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 79, 803-833.

Monge-Fuentes, V., García, M.P., Tavares, M.C., Valois, C.R., Lima, E.C., Teixeira, D.S., Morais, P.C., Tomaz, C., and Azevedo, R.B. (2011). Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus* spp.). *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 6, 1529-1544.

Moros, M., Hernández, B., Garet, E., Dias, J.T., Sáez, B., Grazú, V., González-Fernández, A., Alonso, C., and delaFuente, J.M. (2012). Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake. *ACSnano* 6, 1565-1577.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

Mulder, K.C., Lima, L.A., Miranda, V.J., Dias, S.C., and Franco, O.L. (2013). Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in microbiology* 4, 321.

Murray, C.B., Noms, D.J., and Bawendi, M.G. (1993). Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society* 115, 8706-8715.

Na, H.B., Song, I.C., and Hyeon, T. (2009). Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Advanced Materials* 21, 2133-2148.

Nakajima, N., and Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate chemistry* 6, 123-130.

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* 7, 543-557.

Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., and von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293, 483-496.

Nitin, N., LaConte, L.E., Zurkiya, O., Hu, X., and Bao, G. (2004). Functionalization and peptide-based delivery of magnetic nanoparticles as an intracellular MRI contrast agent. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 9, 706-712.

NNI (2011). The National Nanotechnology Initiative: Research and Development Leading to a Revolution in Technology and Industry (Washington, DC, USA: National Science and Technology Council Committee on Technology).

Oh, J., Feldman, M.D., Kim, J., Condit, C., Emelianov, S., and Milner, T.E. (2006). Detection of magnetic nanoparticles in tissue using magneto-motive ultrasound. *Nanotechnology* 17, 4183-4190.

Ostwald, W. (1896). *Lehrbuch der Allgemeinen Chemie*, Vol 2 (Leipzig, Germany).

Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., and Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 36, R167-R181.

Park, J., Lee, E., Hwang, N.M., Kang, M., Kim, S.C., Hwang, Y., Park, J.G., Noh, H.J., Kim, J.Y., Park, J.H., *et al.* (2005). One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 2873-2877.

Park, K. (2013). Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. *ACSnano* 7, 7442-7447.

Perea, S.E., Reyes, O., Baladron, I., Perera, Y., Farina, H., Gil, J., Rodriguez, A., Bacardi, D., Marcelo, J.L., Cosme, K., *et al.* (2008). CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both *in vitro* and *in vivo*. *Molecular and cellular biochemistry* 316, 163-167.

Perea, S.E., Reyes, O., Puchades, Y., Mendoza, O., Vispo, N.S., Torrens, I., Santos, A., Silva, R., Acevedo, B., López, E., *et al.* (2004). Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (Casein Kinase 2). *Cancer Research* 64, 7127-7129.

Perrault, S.D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H.C., and Chan, W.C.W. (2009). Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano Letters* 9, 1909-1915.

Petros, R.A., and DeSimone, J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery* 9, 615-627.

Prijic, S., and Sersa, G. (2011). Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiology and oncology* 45, 1-16.

Qin, J., Li, K., Peng, C., Li, X., Lin, J., Ye, K., Yang, X., Xie, Q., Shen, Z., Jin, Y., *et al.* (2013). MRI of iron oxide nanoparticle-labeled ADSCs in a model of hindlimb ischemia. *Biomaterials* 34, 4914-4925.

Rahman, M., Ahmad, M.Z., Kazmi, I., Akhter, S., Kumar, Y., Ahmad, F.J., and Anwar, F. (2012). Novel approach for the treatment of cancer: Theranostic nanomedicine. *Pharmacologia* 3.

Raikher, Y.L., and Shliomis, M.I. (1974). Limiting viscosity of ferromagnetic suspensions in a strong magnetic field. *Journal of Applied Mechanics and Technical Physics* 15, 470-475.

Re, F., Moresco, R., and Masserini, M. (2012). Nanoparticles for neuroimaging. *Journal of Physics D: Applied Physics* 45, 073001.

Reddy, L.H., Arias, J.L., Nicolas, J., and Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical reviews* 112, 5818-5878.

Roca, A.G., Marco, J.F., Morales, M.P., and Serna, C.J. (2007). Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* 111, 18577-18584.

Roca, A.G., Morales, M.P., O'Grady, K., and Serna, C.J. (2006). Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. *Nanotechnology* 17, 2783-2788.

Roca, A.G., Veintemillas-Verdaguer, S., Port, M., Robic, C., Serna, C.J., and Morales, M.P. (2009). Effect of nanoparticle and aggregate size on the relaxometric properties of MR contrast agents based on high quality magnetite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry (B)* 113, 7033-7039.

Rodriguez, I., Perez-Rial, S., Gonzalez-Jimenez, J., Perez-Sanchez, J., Herranz, F., Beckmann, N., and Ruiz-Cabello, J. (2008). Magnetic resonance methods and applications in pharmaceutical research. *Journal of pharmaceutical sciences* 97, 3637-3665.

Rosen, J.E., Chan, L., Shieh, D.B., and Gu, F.X. (2012). Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8, 275-290.

Rosensweig, R.E. (1982). Magnetic Fluids. *Scientific American* 247, 136 - 145.

Ruiz, A., Hernández, Y., Cabal, C., González, E., Veintemillas-Verdaguer, S., Martínez, E., and Morales, M.P. (2013a). Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. *Nanoscale* 5, 11400-11408.

Ruiz, A., Salas, G., Calero, M., Hernández, Y., Villanueva, A., Herranz, F., Veintemillas-Verdaguer, S., Martínez, E., Barber, D.F., and Morales, M.P. (2013b). Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta biomaterialia* 9, 6421-6430.

Safdarian, M., Hashemi, P., and Adeli, M. (2013). One-step synthesis of agarose coated magnetic nanoparticles and their application in the solid phase extraction of Pd(II) using a new magnetic field agitation device. *Analytica Chimica Acta* 774, 44– 50.

Salafranca, J., Gazquez, J., Perez, N., Labarta, A., Pantelides, S.T., Pennycook, S.J., Batlle, X., and Varela, M. (2012). Surfactant organic molecules restore magnetism in metal-oxide nanoparticle surfaces. *Nano Lett* 12, 2499-2503.

Salas, G., Casado, C., Teran, F.J., Miranda, R., Serna, C.J., and Morales, M.P. (2012). Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry* 22, 21065.

Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H., and Pinna, L.A. (2009). Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 847-859.

Sanhai, W.R., Sakamoto, J.H., Canady, R., and Ferrari, M. (2008). Seven challenges for nanomedicine. *Nature nanotechnology* 3, 242-244.

Santra, S., Tapeç, R., Theodoropoulou, N., Dobson, J., Hebard, A., and Tan, W. (2001). Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. *Langmuir* 17, 2900-2906.

Scarberry, K.E., Dickerson, E.B., McDonald, J.F., and Zhang, Z.J. (2008). Magnetic nanoparticle-peptide conjugates for *in vitro* and *in vivo* targeting and extraction of cancer cells. *Journal of American Chemical Society* 130, 10258-10262.

Sharrock, M.P. (1989). Particulate magnetic recording media: a review *IEEE Transactions on Magnetics* 25, 4374-4389.

Sheehan, J.C., and Hess, G.P. (1995). A new method of forming peptide bonds. *Journal of American Chemical Society* 77, 1067-1068.

Shen, H., Jawaid, A.M., and Snee, P.T. (2009). Poly(ethylene glycol) carbodiimide coupling reagents for the biological and chemical functionalization of water-soluble nanoparticles. *acsnano* 3, 915-923.

Shin, J., Anisur, R.M., Ko, M.K., Im, G.H., Lee, J.H., and Lee, I.S. (2009). Hollow manganese oxide nanoparticles as multifunctional agents for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 321-324.

Shubayev, V.I., Pisanic, T.R., and Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews* 61, 467-477.

Si, S., Kotal, A., Mandal, T.K., Giri, S., Nakamura, H., and Kohara, T. (2004). Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles in the Presence of Polyelectrolytes. *Chemistry of Materials* 16, 3489-3496.

Singh, A., and Sahoo, S.K. (2013). Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug Discovery Today*.

Soenen, S.J., and Cuyper, M.D. (2009). Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast media & molecular imaging* 4, 207-219.

Solanki, A., Kim, J.D., and Lee, K.B. (2008). Special focus: nanomaterials for biomedical diagnosis - review. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 3, 567-578.

Song, L., Zhu, D., Liu, L., Dong, X., Zhang, H., and Leng, X. (2010). Evaluation of the coagulation properties of arginine-chitosan/DNA nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 95, 374-379.

Steinman, R.M., Brodie, S.E., and Cohn, Z.A. (1976). Membrane flow during pinocytosis: A Stereologic Analysis. *The Journal of Cell Biology* 68, 665-687.

Su, Y.C., Chen, B.M., Chuang, K.H., Cheng, T.L., and Roffler, S.R. (2010). Sensitive quantification of PEGylated compounds by second-generation anti-poly(ethylene glycol) monoclonal antibodies. *Bioconjugate chemistry* 21, 1264-1270.

Sun, C., Du, K., Fang, C., Bhattarai, N., Veiseh, O., Kievit, F., Stephen, Z., Lee, D., Ellenbogen, R.G., Ratner, B., *et al.* (2010). PEG-mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: Their physicochemical properties and function in vivo. *ACSNano* 4, 2402-2410.

Sun, C., Sze, R., and Zhang, M. (2006). Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *Journal of biomedical materials research Part A* 78, 550-557.

Sun, S., and Zeng, H. (2002). Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 124, 8204-8205.

Sun, S., Zeng, H., Robinson, D.B., Raoux, S., Rice, P.M., Wang, S.X., and Li, G. (2004). Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) Nanoparticles. *Journal of American Chemical Society* 126, 273-279.

Taboada, E., Rodríguez, E., Roig, A., Oró, J., A. Roch, and Muller, R.N. (2007). Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. *Langmuir* 23, (8), 4583-4588.

Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I.H., Temiz, H.T., Yegenoglu, H., Daniel, P., Dinçer, I., and Elerman, Y. (2013). Gold-coated iron composite nanospheres targeted the detection of *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6223-6240.

Tartaj, P., González-Carreño, T., Bomati-Miguel, O., Serna, C.J., and Bonville, P. (2004). Magnetic behavior of superparamagnetic Fe nanocrystals confined inside submicron-sized spherical silica particles. *Physical Review B* 69, 094401.

Tartaj, P., Morales, M.P., González-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S., and Serna, C.J. (2011). The iron oxides strike back: From biomedical applications to energy storage devices and photoelectrochemical water splitting. *Advanced Materials* 23, 5243-5249.

Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A., and Ahmed, K. (2001). Protein kinase CK2 signal in neoplasia *Histology and Histopathology* 16, 573-582.

Thomas, K., Aguar, P., Kawasaki, H., Morris, J., Nakanishi, J., and Savage, N. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicological Sciences* 92, 23-32.

Tivesten, A., Bollano, E., Caidahl, K., Kujacic, V., Sun, X.Y., Hedner, T., Hjalmarson, A., and Bengtsson, B.A. (2000). The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 141, 60-66.

Tripathi, A., Melo, J.S., and D'Souza, S.F. (2013). Uranium (VI) recovery from aqueous medium using novel floating macroporous alginate-agarose-magnetite cryobeads. *Journal of hazardous materials* 246-247, 87-95.

Tseng, W.K., Chieh, J.J., Yang, Y.F., Chiang, C.K., Chen, Y.L., Yang, S.Y., Horng, H.E., Yang, H.C., and Wu, C.C. (2012). A noninvasive method to determine the fate of Fe₃O₄ nanoparticles following intravenous injection using scanning SQUID biosusceptometry. *PloS one* 7, e48510.

Valois, C.R., Braz, J.M., Nunes, E.S., Vinolo, M.A., Lima, E.C., Curi, R., Kuebler, W.M., and Azevedo, R.B. (2010). The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a beta2 integrin-dependent pathway. *Biomaterials* 31, 366-374.

Verma, A., and Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12-21.

Villanueva, A., Canete, M., Roca, A.G., Calero, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C.J., Morales Mdel, P., and Miranda, R. (2009). The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 20, 115103.

Vogler, E.A., and Siedlecki, C.A. (2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* 30, 1857-1869.

- Vuong, Q.L., Berret, J.F., Fresnais, J., Gossuin, Y., and Sandre, O. (2012). A universal scaling law to predict the efficiency of magnetic nanoparticles as MRI T(2)-contrast agents. *Advanced healthcare materials* 1, 502-512.
- Wang, R., Billone, P.S., and Mullett, W.M. (2013). Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials* 2013, 629681.
- Wang, Y.X. (2011). Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery* 1, 35-40.
- Wang, Y.X., Hussain, S.M., and Krestin, G.P. (2001). Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology* 11, 2319-2331.
- Waterhouse, D.N., Tardi, P.G., Mayer, L.D., and Bally, M.B. (2001). A comparison of liposomal formulations of Doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles *Drug Safety* 24, 903-920.
- Wattendorf, U., and Merkle, H.P. (2008). PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 97, 4655-4669.
- Waugh, D.S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* 23, 316-320.
- Weaver, J.B., Zhang, X., Kuehlert, E., Toraya-Brown, S., Reeves, D.B., Perreard, I.M., and Fiering, S. (2013). Quantification of magnetic nanoparticles with low frequency magnetic fields: compensating for relaxation effects. *Nanotechnology* 24, 325502.
- Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N., Stadler, J., Tilbury, L., and Smith, D. (2007). PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metabolism and Disposition* 35, 9-16.
- Webster, R., Elliott, V., Park, B.K., Walker, D., Hankin, M., and Taupin, P. (2009). PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, F.M. Veronese, ed. (Birkhäuser Basel), pp. 127-146.
- Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., and Lewis, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology* 152, 167-173.
- Westbrook, C. (2002). *MRI at a Glance* (Blackwell Science Ltd).
- Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.-C., and Gazeau, F. (2003). Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24, 1001-1011.

Wilhelm, C., and Gazeau, F. (2008). Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 29, 3161-3174.

Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J.N., and Bacri, J.-C. (2002). Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* 18, 8148-8155.

Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., and Schlag, P.M. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology* 3, 487-497.

Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y., and Sun, S. (2007). Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Advanced Materials* 19, 3163-3166.

Xiong, F., Zhu, Z.Y., Xiong, C., Hua, X.Q., Shan, X.H., Zhang, Y., and Gu, N. (2012). Preparation, characterization of 2-deoxy-D-glucose functionalized dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles for targeting tumor cells. *Pharm Res* 4, 1087-1097.

Yallapu, M.M., Foy, S.P., Jain, T.K., and Labhasetwar, V. (2010). PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications. *Pharm Res* 27, 2283-2295.

Yanli Liu, M.K.S., Joseph Ryan, Eric D. Kaufman, Stefan Franzen,, and Feldheim, a.D.L. (2007). Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide-Poly(ethylene glycol) Monolayers. *Anal Chem* 79, 2221-2229.

Yoo, M.K., Park, I.K., Lim, H.T., Lee, S.J., Jiang, H.L., Kim, Y.K., Choi, Y.J., Cho, M.H., and Cho, C.S. (2012). Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging. *Acta biomaterialia* 8, 3005-3013.

Yue-Jian, C., Juan, T., Fei, X., Jia-Bi, Z., Ning, G., Yi-Hua, Z., Ye, D., and Liang, G. (2010). Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug development and industrial pharmacy* 36, 1235-1244.

Zhang, J., Rana, S., Srivastava, R.S., and Misra, R.D.K. (2008). On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. *Acta biomaterialia* 4, 40-48.

Zhang, X.X., Eden, H.S., and Chen, X. (2012). Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. *Journal of Control Release* 159, 2-13.

Zhang, Y., Kohler, N., and Zhang, M. (2002). Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 23, 1553-1561.

Zheng, Y.H., Cheng, Y., Bao, F., and Wang, Y.S. (2006). Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Materials Research Bulletin* 41, 525-529.

Curriculum vitae

Datos personales

Nombre: Gladys Amalia Ruiz Estrada

Fecha de nacimiento: 12 de marzo de 1985

Nacionalidad: Cubana

Correo electrónico: amaliaruiz@icmm.csic.es, amaliaruiz2009@gmail.com

Formación

2008- Licenciatura en Bioquímica, Universidad de La Habana, Cuba

2012- Máster en Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid, España

Experiencia Investigadora

2008-hasta la actualidad: Centro de Estudios Avanzados de Cuba

2009-2010: Centro Nacional de Biotecnología/ Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (Beca de formación para jóvenes investigadores B01CU2009-2010)

2011-hasta la actualidad- Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (Beca de doctorado dentro del Proyecto de Colaboración Científica CSIC-CITMA)

Asistencia a Congresos

1) II Seminario Internacional de participante 2008
Cubananociencias y nanotecnologías

2) I Congreso Iberoamericano de Química, póster 2009
Cuba, Bioquímica e Ingeniería Química. VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química.

| | | | |
|----|---|--------------|------|
| 3) | III Seminario Internacional de Cuba Nanociencias y nanotecnologías | póster | 2010 |
| 4) | XIV Congreso de la Sociedad España Española de Biología Celular | póster | 2011 |
| 5) | Trends in Nanotechnology España | charla | 2012 |
| 6) | IV Seminario Internacional de Cuba Nanociencias y nanotecnologías | charla | 2012 |
| 7) | E-MRS 2013 SPRING MEETING Francia | charla | 2013 |
| 8) | E-MRS 2013 SPRING MEETING Francia | póster | 2012 |
| 9) | IV Encontro do INCT Nanobiotecnologia Brasil | participante | 2013 |

Cursos de Formación

| | | | | |
|----|--|------------------|------|-----------|
| 1) | Biomoléculas | Fac. de Biología | 2008 | Cuba |
| 2) | Enzimología | Fac. de Biología | 2008 | Cuba |
| 3) | Métodos Bioquímicos | Fac. de Biología | 2008 | Cuba |
| 4) | Diplomado en Introducción a las Nanociencias y Nanotecnologías | INTEC | 2008 | Cuba |
| 5) | Micelas, obtención y caracterización química y estructural | IMRE | 2008 | Cuba |
| 6) | Nanoanalytical studies of biologically and tribologically relevant surfaces and devices | IMRE | 2008 | Cuba |
| 7) | Introducción a los nanomateriales | CNIC | 2009 | Cuba |
| 8) | Principios de Farmacología | CIGB | 2009 | Cuba |
| 9) | Curso de formación de recursos humanos en nanociencias y nanotecnologías | IVIC | 2009 | Venezuela |

| | | | | |
|-----|--|------------------|------|--------|
| 10) | Proteínas y Enzimas | Fac. de Biología | 2009 | Cuba |
| 11) | Ingeniería de materiales aplicado a la biomedicina | CNIC | 2009 | Cuba |
| 12) | Análisis de estructuras de Macromoléculas | CNB | 2010 | España |
| 13) | Máster en Biotecnología | UAM | 2012 | España |
| 14) | Fronteras en Ciencia de Materiales | ICMM | 2013 | España |

Estancias de Investigación

2013 (3 meses): Universidad de Brasilia (Beca de Desarrollo Tecnológico, INCT, UnB, Brasil). Responsable: Profesor Ricardo Bentes de Azevedo

Participación en Proyectos de Investigación

- 1) Estudio de la reacción de PEGilación del IFN- α 2b con un PEG ramificado (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología)
- 2) Tamizaje de Actividad Inhibidora de APN/CD13 de riñón porcino y de actividad tipo APN en extractos acuosos de organismos marinos (Facultad de Biología, Universidad de La Habana)
- 3) Obtención y caracterización de la Eritropoyetina PEGilada (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y Centro de Inmunología Molecular). Patente: R. Páez, D. E. Amaro, F. R. Castro, Y. Hernández, G. A. Ruiz. Conjugado que comprende Eritropoyetina y una estructura polimérica ramificada. CU2014-03 (2014)
- 4) Desarrollo de nanopartículas magnéticas como sistema de liberación controlada de RNA de interferencia (Centro Nacional de Biotecnología e Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid)
- 5) Desarrollo de un sistema de liberación de fármacos basado en nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenglicol para el tratamiento de diferentes enfermedades (Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid)

Lista de Publicaciones

E. Hardy, J. Ramon, V. Saez, R. Báez, Y. Tejeda, A. Ruiz. "Detection of PEGylated proteins in polyacrylamide gels by reverse staining with zinc and imidazole salts *Electrophoresis* 29 (11), 2363 (2008)

A. Ruiz, G. Salas, M. Calero, Y. Hernández, A. Villanueva, F. Herranz, S. Veintemillas-Verdaguer, E. Martínez, D. F. Barber and M.P. Morales. "Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents *Acta Biomaterialia* 9 (5), 6421-6430 (2013)

A. Ruiz, Y. Hernández, C. Cabal, E. González, S. Veintemillas-Verdaguer, E. Martínez and M.P. Morales. "Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol" *Nanoscale* DOI:10.1039/C3NR01412F.

Trabajos en redacción:

A. Ruiz, M.P. Morales, P.C. Morais, R.B. Azevedo, Z.G.M. Lacava; Synthesis, characterization and biomedical applications of DMSA coated nanoparticles (review)

I. Angulo, A. Ruiz, Y. Luengo, M.P. Morales, J.M. Mancheño; Agarose coated nanoparticles for biotechnological applications

A. Ruiz, M. Martín, D.F. Barber, M.P. Morales, L. Kremer; Bioactivity assay for *in vitro* characterization and quantification of PEGylated magnetic iron oxide nanoparticles

A. Ruiz, L.M. Alí, P. Cáceres, R.B. Azevedo, M.P. Morales, A. Millán; Magnetite nanoparticles influence in hematological parameters: *In vitro* and *in vivo* study

A. Ruiz, P. Cáceres, S. B. Chaves, M.P. García, A.D. dos Santos, L. Gutiérrez, R.B. Azevedo, M.P. Morales, Detection and quantification of PEG-coated iron oxide nanoparticles after intravenous injection in Wistar rats

Agradecimientos

Parece que fue ayer que llegué a Madrid y me parece increíble que ya me toque sentarme a echar la vista atrás para cerrar mi actual “plan quinquenal”.

En primer lugar, y como no podía ser de otra manera, me gustaría agradecerle a mi directora de tesis, María del Puerto Morales Herrero, por haberme dado esta oportunidad a fines de 2010 cuando creía que todas las puertas del mundo se me habían cerrado. Por su infinita paciencia en tratar de que yo entienda algo de este mundillo de las nanopartículas, por todo su apoyo y bondad. Creo que en “cubano” la frase que mejor resume la idea de cariño, respeto y admiración por una persona es decirle “Cuando yo sea grande quiero ser como tú...”

Me gustaría agradecer al Convenio de Cooperación Científica CSIC (España)-CITMA (Cuba) que hizo posible la realización de esta tesis doctoral. Gracias por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto maravilloso y apasionante.

Llevar a cabo esta tesis ha sido gracias a la participación de muchísimas personas:

En el ICMM hay mucha gente a la que dar las gracias. A mis compañeros de laboratorio, a Gorka que me enseñó a sintetizar estas benditas/malditas partículas (depende de cómo tengan ellas el día y decidan precipitarse o pasar felizmente por el filtro de 0,22). Ojalá un día me salgan partículas tan chulas como a ti. A Yurena por tanta partícula de coprecipitación donada a la causa de esta tesis. Si no fuera por ti, esta tesis tendría un capítulo menos y me hubiera perdido los cuentos maravillosos de Jean Manuelle y el flaco con parásitos de París, la cama con arena de Ámsterdam o cómo pescar una cartera con una sombrilla en el Coliseo. A Marzia por compartir mi sufrimiento y dolores de cabeza durante mil síntesis polidispersas o partículas malditas que se quedan en los filtros, por toda su ayuda en los procesos de recubrimiento. A Lucía por sus infinitas horas dedicadas a hacer medidas en el SQUID, por intentar que yo entienda que cosa es “en fase y fuera de fase”, por estar siempre atenta para ayudar en lo que sea. A Rocío, por venirme a alegrar en la etapa de agonía del final de tesis en la soledad del despacho, y por haberme pasado, al inicio de los tiempos, ese protocolo de oro para la modificación con PEG que gracias a eso pude tener tesis. A Vero por tantas risas, alegrías y cariño. A Mari Carmen por su eterna disposición para ayudarnos y ordenarnos un poco más la vida en el laboratorio. A Sabino, Teresita y Serna por toda su ayuda, comentarios y consejos que han contribuido a sacar adelante este trabajo.

También quería agradecer a esos amigos del desayuno de cada día, porque no hay mejor forma de hacer una tesis que después de tomarme el desayuno con ustedes: Isabel, Virginia, Sandra, Wilmer, Kamel, Vero, Yurena, Marzia, Gorka y Puerto.

Al Dr. Ariel Felipe, por todo su esfuerzo de coordinación y valioso apoyo durante estos años.

Al Dr. Eduardo Martínez que me permitió seguir vinculada al CIGB, que es el centro donde “me crié”. Gracias por todo su apoyo y ayuda en la movilización de tantos recursos para la realización de esta tesis. Cualquiera que conozca las difíciles condiciones de trabajo en nuestra isla sabrá a lo que me refiero.

A todo el equipo de trabajo del CIGB que ha hecho posible esta tesis: A Yenisel Hernández, mi ángel de la guarda, capaz de remover cielo y tierra para conseguir sacar un experimento. A Yanet Terrero en el Grupo de Analítica por sus noches de guardia frente al HPLC. Al Dr. Carlos Cabal y al Dr. Evelio González por su gran ayuda en el tema de Resonancia Magnética Nuclear. Al Dr. Silvio Perea y al Dr. Yasser Perera por su apoyo en el trabajo con el CIGB300. A toda la gente del Área de Desarrollo que han hecho posible que mis fugaces estancias en el CIGB durante estos años me rindan muchísimo y me hagan sentirme siempre feliz de volver a casa, en especial a Liurdis, Yadira, Ramsés, Yasser, Raymersy, Elián, Yanelis, Fidel y Páez.

También tengo que agradecer muchísimo a todos los colaboradores de esta tesis. A veces pienso que yo no he hecho nada (o muy poco) porque aquí hay demasiadas horas de trabajo de otras personas a las que les tengo que estar eternamente agradecida. En especial al Profesor Ricardo Bentes de Azevedo de la Universidad de Brasilia y a su maravilloso grupo de trabajo: Paolín, Djalma, Sacha, Luiza, Mónica, Luisa, Victoria, Janaina, Sebastian, Graziela, Ana paula, Ana Lygia, Luis, Jivago y Zelia. Seguro alguien se me olvida y pido perdón, pero siempre les agradeceré la acogida que me dieron durante tres meses y lo mucho que se esforzaron por ayudarme a sacar en tiempo record todos los experimentos con las raticas.

A la Dr. Ángeles Villanueva de la Universidad Autónoma de Madrid, por toda su guía y apoyo en el trabajo de Biología Celular, y por supuesto, a esas chicas maravillosas de su laboratorio que tanto me han enseñado y ayudado con las celulitas: Pilar, Macarena y Ana, muchísimas gracias.

Al Dr. José Miguel Mancheño y a Iván Angulo, del Instituto de Química-Física Rocasolano, por ese hermoso proyecto de inmovilización de lectinas sobre las nanopartículas recubiertas de agarosa, por las maravillosas discusiones de resultados que me recuerdan un poco que todavía soy bioquímica.

Al Dr. Angel Millán, Dr. Fernando Palacios y L. Alí por todo el trabajo desarrollado en la Universidad de Zaragoza con el estudio de la influencia de las nanopartículas en los diferentes parámetros hematológicos.

A la Dr. Leonor Kremer y Mayte Martín del Centro Nacional de Biotecnología por el trabajo desarrollado en la detección de las nanopartículas empleando un ELISA. Muchas gracias por todas esas discusiones teóricas y por trabajar tan rigurosa e intensamente.

Al Dr. Fernando Herranz y el Profesor Jesús Ruiz Cabello por la colaboración y apoyo del grupo de Imagen del CNIC.

Al Dr. Marco Filice del Instituto de Catálisis y Petróleo-Química por toda su ayuda en la detección y purificación de péptidos mediante HPLC.

A las chicas del Servicio de Análisis Químico del ICMM Carolina y Mari Carmen por tantísimas muestras analizadas, así como a Pedro en el Servicio de Infrarrojo.

Al Dr. José A. Ramón y Eugenio Hardy por haber sido los pilares de mi formación como científica.

Ya fuera de lo científico, también hay mucha gente a la que le tengo que agradecer que hoy yo pueda estar presentando esta memoria. En primer lugar están mis padres con sus infinitas horas de sacrificio, dedicación absoluta y amor para que yo pueda estar aquí hoy, a toda mi familia por supuesto.

A Néstor, por haber estado siempre.

A mis amigas maravillosas por todo su cariño, fidelidad y apoyo en estos años: Ive, Heidi, Ale, Carmen y Esther.

A ese miniCeac de Madrid

A Jorge, por compartir mi vida, mis agobiantes planes quinquenales, por tu amor y paciencia.

No tengo palabras (o mejor dicho, más palabras, porque ya voy por tres páginas) para agradecerles todo lo que han hecho por mí.